

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE BIXINA A PARTIR DE EXTRATO DE

Paricar

URUCUM (*Bixa orellana* L.)

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Carlos Prentice Hernández e aprovada pela Comissão Julgadora em 02.12.94.

CARLOS PRENTICE HERNÁNDEZ *n/nº/m.c.*

Engenheiro de Alimentos-Pescado

Prof. Dr. OLAVO ~~RUSIG~~
Orientador

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

CAMPINAS, 1994

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

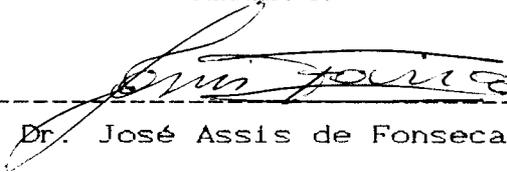
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Olavo Rusig
(orientador)



Prof. Dra. Délia Rodriguez-Amaya
(membro)



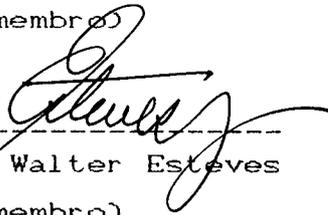
Prof. Dr. José Assis de Fonseca Faria
(membro)



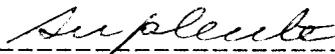
Prof. Dr. Urgel de Almeida Lima
(membro)



Prof. Dr. Eidiomar Angelucci
(membro)



Prof. Dr. Walter Esteves
(membro)



Prof. Dra. Helena Godoy
(membro)

Campinas, 02 de dezembro de 1994.

Aos meus pais
Alejandro e Leonor
(in memoriam)

Aos meus filhos
Carlos e Paulo
dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Olavo Rusig, pela orientação segura, incentivo e atenção.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Dr. Paulo Roberto Nogueira de Carvalho, da Seção de Química de ITAL, pelo auxílio na análise química.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Montealegre, pelo apoio no uso do secador por atomização.

Ao Prof. Tabajara Lucas de Almeida, da Universidade do Rio Grande, pela ajuda e aplicação do programa SANEST na análise estatística.

Aos colegas de pós graduação, Eli, Carlos Alberto, Everardo e Maria Célia, pela amizade sincera.

A todos do Laboratório Geral de Tecnologia de Alimentos, pela disponibilidade com que contribuíram neste trabalho.

A todos mais que me acompanharam e colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

A Myriam, a minha homenagem especial, pelo seu incentivo, colaboração e carinho nas horas difíceis. Com amor.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. CAROTENÓIDES.....	3
2.2. PROPRIEDADES DOS CAROTENÓIDES.....	5
2.3. URUCUM.....	6
2.4. BIXINA.....	8
2.4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	8
2.4.2. MÉTODOS DE ANÁLISE.....	14
2.4.3. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS CORANTES.....	19
2.4.4. TOXICOLOGIA.....	27
2.4.5. ESTABILIDADE.....	28
2.4.6. APLICAÇÕES.....	29
2.5. EMULSÕES DE CORANTES.....	33
2.5.1. GENERALIDADES.....	33
2.5.2. SOLUBILIDADE X HLB.....	33
2.5.3. ESTABILIDADE.....	34
2.6. ADSORÇÃO DE ÁGUA EM PRODUTOS DESIDRATADOS.....	35
2.6.1. SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO..	36
2.6.2. ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE.....	37
2.6.3. VIDA-DE-PRATELEIRA E ESTABILIDADE.....	38
2.6.4. UMIDADE RELATIVA DE EQUILÍBRIO.....	38
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. MATERIAL.....	40
3.2. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL.....	40
3.2.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIXINA DAS SEMENTES DE URUCUM.....	40
3.2.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO-BASE DE URUCUM.....	40
3.2.2.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIXINA DO EXTRATO-BASE.....	41

3.2.2.2.	DETERMINAÇÃO DA UMIDADE.....	41
3.2.3.	OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A EXTRAÇÃO.....	41
3.2.3.1.	TIPO DE SOLVENTE.....	41
3.2.3.2.	TEOR DE BIXINA DAS SEMENTES.....	42
3.2.3.3.	TEMPO DE SECAGEM DO EXTRATO-BASE...	42
3.2.3.4.	RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO.....	42
3.2.4.	IDENTIFICAÇÃO DOS CORANTES.....	43
3.3.	PURIFICAÇÃO DA BIXINA.....	43
3.3.1.	TESTES PRELIMINARES.....	43
3.3.1.1.	UTILIZANDO SOMENTE UM SOLVENTE.....	44
3.3.1.2.	UTILIZANDO MISTURA DE SOLVENTES...	44
3.3.2.	PURIFICAÇÃO POR CRISTALIZAÇÃO.....	45
3.3.2.1.	UTILIZANDO MISTURA DE SOLVENTES...	45
3.3.2.2.	PROPORÇÃO DA MISTURA DE SOLVENTES..	45
3.3.2.3.	RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO POR CRIS- TALIZAÇÃO.....	46
3.3.3.	PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO.....	46
3.3.3.1.	A PARTIR DO EXTRATO-BASE DE URUCUM.	46
3.3.3.1.1.	SOLVENTE ADEQUADO.....	46
3.3.3.1.2.	RELAÇÃO EXTRATO-BASE: SOLVENTE.....	47
3.3.3.1.3.	TEMPERATURA DE PURIFI- CAÇÃO.....	48
3.3.3.1.4.	PURIFICAÇÕES SUCESSI- VAS.....	48
3.3.3.1.5.	MUDANÇA DO pH.....	49
3.3.3.1.6.	RENDIMENTO DA PURIFI- CAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO..	49
3.3.3.1.7.	INCREMENTO DA PUREZA NA PRECIPITAÇÃO.....	50
3.3.3.2.	A PARTIR DE SEMENTES DE URUCUM.....	50
3.3.3.2.1.	MÉTODO ALCALINO.....	50
3.3.3.2.2.	MÉTODO ÁCIDO.....	51
3.4.	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS.....	51

3.4.1.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIXINA.....	51
3.4.2.	ESPECTROFOTOMETRIA.....	51
3.4.3.	CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	52
3.4.4.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA....	52
3.5.	OBTENÇÃO DE UM EXTRATO HIDROMISCÍVEL DE BIXINA	52
3.5.1.	SOLUBILIDADE DO EXTRATO.....	52
3.5.2.	PROCEDIMENTO PARA SECAGEM DO EXTRATO HIDRO- MISCÍVEL.....	53
3.6.	UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS E HIDROMISCÍ- VEL EM UMA FORMULAÇÃO ALIMENTÍCIA.....	53
3.7.	ESTABILIDADE DA BIXINA.....	54
3.7.1.	EFEITO DA LUZ.....	54
3.7.2.	EFEITO DA TEMPERATURA.....	56
3.7.2.1.	UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO PELO MÊ- TODO ALCALINO.....	56
3.7.2.2.	UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO PELO MÊ- TODO ÁCIDO.....	56
3.7.3.	DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO.....	57
3.7.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
3.7.5.	CÁLCULO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE DE REAÇÃO (K) E TEMPO DE MEIA VIDA ($t_{1/2}$).....	59
4-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1.	MATERIAL UTILIZADO.....	60
4.2.	TESTES PRELIMINARES PARA EXTRAÇÃO DE BIXINA.....	60
4.2.1.	OBTENÇÃO DO EXTRATO-BASE.....	60
4.2.2.	IDENTIFICAÇÃO DA BIXINA NO EXTRATO-BASE DE URUCUM.....	64
4.3.	PURIFICAÇÃO DA BIXINA.....	65
4.3.1.	EFEITO DO SOLVENTE.....	65
4.3.2.	CRISTALIZAÇÃO.....	69
4.3.2.1.	EFEITO DOS SOLVENTES.....	69
4.3.2.2.	RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO POR CRIS- TALIZAÇÃO.....	71
4.3.3.	PRECIPITAÇÃO.....	72
4.3.3.1.	A PARTIR DO EXTRATO-BASE DE URUCUM.	72

4.3.3.1.1.	EFEITO DO SOLVENTE.....	72
4.3.3.1.2.	MUDANÇA DO pH.....	76
4.3.3.1.3.	RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO.....	77
4.3.3.2.	A PARTIR DE SEMENTES DE URUCUM.....	78
4.3.3.2.1.	TIPO DE SOLVENTE.....	78
4.3.3.2.2.	TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO.	78
4.3.3.2.3.	EFEITO DO pH NA PURIFICAÇÃO DA BIXINA.....	79
4.3.3.2.4.	RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO.....	81
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS DE BIXINA.....	82
4.4.1.	EXTRATOS OBTIDOS POR METODOLOGIA ÁCIDA....	85
4.4.2.	EXTRATOS OBTIDOS POR METODOLOGIA ALCALINA.	89
4.5.	OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROMISCÍVEL DE URUCUM.....	89
4.5.1.	SOLUBILIDADE DA EMULSÃO.....	89
4.5.2.	SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO.....	90
4.6.	UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS DENTRO DE UMA FORMULAÇÃO ALIMENTÍCIA.....	91
4.7.	ESTABILIDADE DA BIXINA.....	91
4.7.1.	EFEITO DA LUZ.....	91
4.7.2.	EFEITO DA TEMPERATURA.....	98
4.7.2.1.	EXTRATOS OBTIDOS POR METODOLOGIA ALCALINA.....	98
4.7.2.2.	EXTRATOS OBTIDOS POR METODOLOGIA ÁCIDA.....	108
4.7.3.	DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE.....	115
5-	CONCLUSÕES.....	119
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela		Pag.
1	- Pigmentos carotenóides do urucum.....	9
2	- Solventes utilizados para purificar o extrato-base de urucum.....	44
3	- Misturas de solventes utilizadas para purificação do extrato-base de urucum.....	47
4	- Condições de trabalho utilizadas para estudo do efeito das purificações sucessivas da bixina.....	49
5	- Condições experimentais no estudo da estabilidade da bixina em relação à luz.....	55
6	- Concentração de bixina dos extratos alcalinos e tempo de exposição utilizados no estudo do efeito da temperatura na estabilidade.....	56
7	- Concentração de bixina dos extratos ácidos e tempo de exposição utilizados no estudo do efeito da temperatura na estabilidade.....	57
8	- Relação entre as amostras de extrato e as soluções de ácido sulfúrico preparadas para controlar a umidade relativa do meio.....	58
9	- Obtenção de extrato-base de urucum em função do tempo de secagem.....	61
10	- Teor de bixina e umidade no extrato-base de urucum....	62
11	- Relação do conteúdo de bixina presente nas sementes e no extrato-base de urucum e incremento na extração....	63
12	- Purificação de bixina utilizando diferentes solventes.....	66
13	- Purificação de bixina utilizando misturas de solventes.....	68
14	- Purificação de bixina utilizando misturas selecionadas de solventes.....	68
15	- Cristalização de bixina utilizando misturas de solventes.....	69
16	- Cristalização de bixina utilizando diferentes proporções de misturas de solventes.....	71

17	- Rendimento da purificação por cristalização.....	71
18	- Purificação de bixina com diferentes misturas de sol- ventes.....	72
19	- Variações na temperatura de purificação utilizada em relação com a quantidade de bixina e o rendimento fi- nal.....	74
20	- Purificações sucessivas do extrato-base de urucum.....	76
21	- Comportamento do pH nos Métodos A e B.....	76
22	- Relação entre a quantidade de bixina presente e ren-	
23	- Relação entre a quantidade de bixina e o incremento obtido na pureza dos extratos purificados de bixina...	81
24	- Comportamento das emulsões obtidas utilizando Tween 80 e Cremophor RH40.....	89
25	- Estabilidade à luz apresentada pelo refresco prepa- rado utilizando extrato hidromiscível de bixina.....	92
26	- Estabilidade à luz apresentada pelo refresco prepa- rado utilizando extrato purificado de bixina.....	94
27	- Constantes de velocidade de reação (K) e meia-vida ($t_{1/2}$) para degradação da bixina em relação à luz.....	97
28	- Estabilidade à temperatura apresentada pelos extra- tos obtidos por método alcalino aquecidos a 105°C por 0, 2, 4, 8 e 12 horas.....	99
29	- Constantes da velocidade de reação (K) e meia-vida ($t_{1/2}$) para degradação da bixina a 105°C, no extra- obtido por meio alcalino.....	107
30	- Estabilidade à temperatura apresentada pelos extra- tos obtidos por método ácido aquecidos a 105°C por 0, 8, 16 e 24 horas.....	108
31	- Constantes de velocidade de reação (K) e meia-vida ($t_{1/2}$) para degradação da bixina no extrato obtido por meio ácido, a 105°C.....	114
32	- Determinação das isotermas de adsorção para extra- to purificado (L) e hidromiscível (H) de bixina.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pag.
1 - Estrutura química dos pigmentos carotenóides do urucum.....	10
2 - Espectro de absorção da bixina (em clorofórmio).....	13
3 - Extração alcalina a partir de sementes de urucum.....	26
4 - Cromatografia de camada delgada apresentada pelos extratos-base de urucum.....	64
5 - Espectro de absorção apresentado pelo extrato-base de urucum.....	66
6 - Espectros de absorção apresentados pelos extratos purificados de bixina a diferentes temperaturas de purificação.....	74
7 - Rendimento apresentado pelos extratos purificados de bixina a diferentes temperaturas de purificação....	83
8 - Relação entre a quantidade de bixina e o incremento obtido na purificação dos extratos purificados de bixina.....	83
9 - Cromatograma tridimensional apresentado pelo extrato purificado obtido por método ácido, mostrando a presença do isômero <i>cis</i> -bixina.....	84
10 - Cromatografia de camada delgada apresentada pelos extratos purificados de bixina obtidos por metodologia ácida.....	85
11 - Espectros de absorção dos extratos purificados de bixina obtidos por método alcalino.....	86
12 - Cromatogramas (CLAE) dos extratos purificados de bixina obtidos por método alcalino.....	86
13 - Espectros de absorção obtidos pelo detector por arranjo de diodos do extrato purificado B, mostrando a presença dos isômeros <i>cis</i> -bixina e <i>trans</i> -bixina.....	88
14 - Espectros de absorção obtidos pelo detector por arranjo de diodos do extrato purificado E, mostrando a presença de norbixina e <i>trans</i> -bixina.....	88

13	- Espectros de absorção apresentados pelo refresco preparado utilizando extrato hidromiscível de bixina no teste de estabilidade à luz.....	93
16	- Espectros de absorção apresentados pelo refresco preparado utilizando extrato purificado de bixina no teste de estabilidade à luz.....	95
17	- Diferença de coloração, produto da degradação da bixina apresentada pelos dois tipos de refresco utilizado: extrato hidromiscível e extrato purificado de bixina.....	97
18	- Espectros de absorção do extrato de urucum obtido em pH 9,89 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	100
19	- Cromatogramas do extrato de urucum obtido em pH 9,89 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 horas.....	101
20	- Espectros de absorção do extrato de urucum obtido em pH 10,74 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	101
21	- Cromatogramas do extrato de urucum obtido em pH 10,74 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	102
22	- Espectros de absorção do extrato de urucum obtido em pH 11,22 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	102
23	- Cromatogramas do extrato de urucum obtido em pH 11,22 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	103
24	- Espectros de absorção do extrato de urucum obtido em pH 12,52 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	103
25	- Cromatogramas do extrato de urucum obtido em pH 12,52 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	104
26	- Espectros de absorção do extrato de urucum obtido em pH 13,49 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	104
27	- Cromatogramas do extrato de urucum obtido em pH 13,49 e aquecido a 105°C por 0,2,4,8 e 12 horas.....	105

28	- Espectros de absorção do extrato purificado de bixina obtido a 35°C e aquecido a 105°C por 0,8, 16 e 24 horas.....	109
29	- Cromatogramas (CLAE) do extrato purificado de bixina obtido a 35°C e aquecido a 105°C por 0,8, 16 e 24 horas.....	110
30	- Espectros de absorção do extrato purificado de bixina obtido a 40°C e aquecido a 105°C por 0,8, 16 e 24 horas.....	110
31	- Cromatogramas (CLAE) do extrato purificado de bixina obtido a 40°C e aquecido a 105°C por 0,8, 16 e 24 horas.....	111
32	- Perda de bixina apresentada pelo extratos purificados de bixina obtidos a 35°C e 40°C e aquecidos a 105°C por 0,8,16 e 24 horas.....	114
33	- Isotermas de adsorção obtidas a partir do extrato purificado e extrato hidromiscível de bixina.....	116

RESUMO

Foi obtido um extrato purificado de bixina, de coloração vermelha escura, a partir de extrato-base de urucum (*Bixa orellana* L.). Este corante natural foi obtido por precipitação ácida e alcalina dos cristais de bixina. A estabilidade do pigmento foi estudada em função da temperatura (105°C) e luz (900 lux) bem como a umidade crítica apresentada pelos extratos.

O extrato-base de urucum foi obtido utilizando álcool etílico como solvente. A bixina purificada foi obtida por precipitação ácida, depois de extrair o corante com solventes de diferentes polaridades, tais como a acetona e o álcool isopropílico, comparando esta metodologia com a precipitação ácida e alcalina e a cristalização a frio do extrato obtido a partir de sementes de urucum.

O rendimento de extração de bixina em base seca, variou de 35,5 a 65,5%. A purificação dos extratos com 65,5% de bixina em acetona e isopropanol a 35°C, forneceu cristais de bixina com 94,7% de pureza, sendo o incremento na pureza de 1,45 vezes. Em extratos obtidos a partir de sementes de urucum, utilizando métodos alcalinos sob temperatura ambiente, foi obtida bixina com 73,4% de pureza. Isto foi comparado com um método integrado de extração e purificação que forneceu 69,3% de bixina.

Os efeitos da temperatura e luz sobre a estabilidade da bixina foi estudada pela perda da absorvância com o tempo. Desses dados, a velocidade de reação e o tempo-de-meia-vida para bixina em cada sistema foram determinados. A temperatura foi o agente mais destrutivo, seguido da luz.

Foi determinada a umidade crítica utilizando isotermas de adsorção para o extrato purificado de bixina obtido do

extrato-base de urucum, em comparação com um extrato de urucum hidromiscível seco por atomização que mostrou maior capacidade de absorção de água. Estes extratos também foram utilizados para preparar uma bebida empregando uma formulação comercial.

SUMMARY

Purified dark red extract of bixin was obtained from crude extract of annatto (*Bixa orellana* L.). This natural colorant was obtained by acid and alkaline precipitation of the crystals of bixin. The stability of the pigment was studied as a function of temperature (105°C) and as well lighth as critical moisture from the extracts.

Crude extract of annatto was obtained with ethyl alcohol as solvent. Purified bixin was obtained by acid precipitation, after extraction of colorant with other solvents of different polarities, such as acetone and isopropyl alcohol. This methodology was compared with the acid and alkaline precipitation and cold crystallization of extract obtained from annatto seeds.

The extraction yield of bixin on a dry weight basis, varied between 35.5 and 65.5%. Purification of extracts with 65.5% bixin in acetone and isopropyl alcohol at 35°C, furnished bixin crystals of 94.7% purity, with an increase in purity being 1.5 fold. In extracts obtained from annatto seeds, using alkaline methods under ambient temperature, bixin with 73.4% purity was obtained. This was compared with an integrated method of extraction and purification that furnished 69.3% of bixin.

The effects of temperature and lighth on the stability of the bixin was studied by measuring the loss of absorbance with time. From these data, the reaction rate and half life for bixin in each system were determined. Temperature was the most destructive agent, followed by light.

Critical moisture was determined using sorption isotherms determined for the purified extract of bixin obtained from crude extract of annatto, and compared with water-miscible extract

obtained by spray-drying, which showed the highest capacity of water absorption. These extracts were also used to prepare a drink employing a commercial formulation.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 87 % das percepções sensoriais do ser humano são captadas pela visão. Isso demonstra a grande importância das cores no mundo em que vivemos, particularmente nos alimentos e bebidas, os quais, quando ingeridos farão parte da constituição do nosso corpo. Os corantes são utilizados numa infinidade de alimentos "in natura" e industrializados, estando associados a vários fatores ligados ao consumidor como: aspectos sociais, étnicos, geográficos e históricos (ANGELUCCI, 1989).

Segundo o Padrão do Comitê do Codex Alimentarius sobre Aditivos para Alimentos, os corantes para alimentos podem ser utilizados com o propósito de restaurar a cor perdida durante o processamento, ou para padronizar a cor, desde que o corante adicionado não engane ou induza o erro do consumidor, ocultando danos ou valor inferior, ou para fazer que o produto pareça de maior importância que o valor real (DENNER, 1990).

Recentemente tomou-se consciência das características possivelmente tóxicas de muitos corantes e vários países tomaram medidas para regular sua utilização em produtos alimentares, cosméticos, medicinais, e outros. Um dos resultados dessa atitude tem sido um interesse maior pelos corantes naturais que geralmente oferecem menores inconvenientes toxicológicos. Japão, Estados Unidos, países europeus e asiáticos pesquisam cada vez mais a ação deletéria dos corantes artificiais e procuram substituí-los pelos naturais, como o urucum, cúrcuma, clorofila e outros.

O corante urucum tem sido utilizado em suas várias formas intensivamente na indústria da alimentação, particularmente em laticínios e salsicharia (INGRAM & FRANCIS, 1969).

Embora a produção comercial de urucum esteja bem distribuída pelas regiões tropicais, os principais países produtores estão na América Latina, Caraíbas e Índia. O Brasil exporta sementes de urucum, mas seria desejável exportar o corante industrializado, e não a matéria-prima. Porém, a tecnologia para obtenção dos produtos pertence às empresas multinacionais, e são mantidas como segredos industriais ou patenteados pelas mesmas.

A bixina é o principal corante presente nas sementes de urucum e pertence à classe dos carotenóides. No comércio há preparações lipossolúveis e hidromiscíveis de urucum. É um dos corantes naturais mais estáveis mas degrada pela ação da luz e do calor (GOODWIN, 1976; DAMASCENO, 1988).

Como o teor de bixina das sementes pode variar de acordo com o tipo de cultura, a secagem das sementes e o tempo de armazenagem, é importante obter-se um extrato de urucum uniforme, com elevado grau de pureza e de concentração conhecida, para facilitar seu emprego na indústria de alimentos.

O objetivo do presente trabalho foi obter um extrato purificado de bixina com elevado grau de pureza, a partir de um extrato-base de urucum, viável tecnicamente para uso na indústria de alimentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - CAROTENÓIDES

Os carotenóides formam um dos mais importantes grupos de corantes naturais e tem sido encontrados em todas as famílias dos reinos vegetal e animal. Estima-se que mais de 100 milhões de toneladas são produzidas anualmente na natureza (ISLER, 1971)

Os carotenóides podem ser classificados em carotenos (hidrocarbonetos) e xantofilas (derivados oxigenados). A estrutura básica reflete sua maneira de biossíntese e consiste de oito unidades isoprenóides colocadas de maneira que os dois grupos metila laterais mais próximos do centro da molécula estão na posição 1,6, enquanto que todos os outros grupos estão na posição 1,5. Uma série de ligações duplas conjugadas constitui o grupo cromóforo característico. A estrutura acíclica básica C₄₀ pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação (BRITTON, 1976; DAVIES, 1976).

Botânicos e químicos desde o tempo de Berzelius tem pesquisado os carotenóides e acumulado uma vasta quantidade de informação referente a sua presença, identificação e propriedades físicas (HASSELT, 1911; KUHN & WINTERSTEIN, 1928; KUHN & EHMANN, 1929; MAYER, 1943; ZECHMEISTER & ESCUE, 1944).

A presença na natureza de pigmentos vermelhos ou amarelos, hoje identificados como carotenóides, tem sido citada há mais de um século, mas o estudo da química dessas substâncias pode, para propósitos mais práticos, ser considerada como tendo tido início a partir de 1920. As estruturas de alguns dos seus representantes mais facilmente avaliados foram determinadas principalmente através do trabalho da escola de Karrer. Outros importantes estudos foram realizados por Kuhn, Zechmeister, Heilbron e seus respectivos colaboradores (MOSS & WEEDON, 1976).

Continuando com esses estudos pioneiros, muita importância foi dada à síntese dos carotenóides e polienos relacionados. Um produto contendo aparentemente traços de β -caroteno foi obtido como vitamina A por Karrer e Schwyzer em 1948, mas a síntese total definitiva total dos carotenóides, em quantidades isoláveis, foi conseguida primeiro com β -caroteno e licopeno, em 1950 e com o carotenóide oxigenado *trans*-metilbixina, todos pelo mesmo sistema básico, desenvolvido independentemente em vários laboratórios. A faixa dos métodos sintéticos no campo dos carotenóides tem-se estendido grandemente, principalmente pelos grupos de Karrer, Inhoffen, Weedon, Isler e Pommer. Como resultado disso, muitos carotenóides naturais tem sido sintetizados (MOSS & WEEDON, 1976).

Desde 1950 tem sido dada atenção à maneira de como os carotenóides são formados na natureza e as principais vias biossintéticas têm sido reveladas por diferentes trabalhos. Nos últimos anos, com a adoção das técnicas espectroscópicas, principalmente a ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa, tem revolucionado os estudos estruturais nesse campo. Como resultado, muitos novos carotenóides, representando novos tipos de estruturas tem sido reconhecidos e o número continua a crescer. Outro fato neste mesmo período é o avanço conseguido com a ajuda de outras técnicas espectroscópicas, tais como a dispersão óptica rotatória, o dicroísmo circular e a cristalografia de raios X para elucidar a configuração dos carotenóides naturais (MOSS & WEEDON, 1976).

Com exceção de alguns glicosídeos tais como crocina, digentiobiosídeo da crocetina, e alguns complexos protéicos, como a astaxantina, os carotenóides são pigmentos oleossolúveis que podem ser isolados por extração com um solvente apropriado, por exemplo benzeno, éter etílico (livre de peróxidos), dissulfeto de carbono, etanol, metanol ou clorofórmio (livre de ácidos). Após a evaporação do extrato obtem-se matéria bruta que ocasionalmente

precisa ser cristalizada para obter-se o produto desejado. Usualmente, porém, é necessário realizar uma purificação preliminar (MOSS & WEEDON, 1976).

2.2 - PROPRIEDADES GERAIS DOS CAROTENÓIDES

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (1988), o estudo dos carotenóides, pigmentos amplamente encontrados na natureza, é um campo de pesquisa iniciado no século passado, mas que ainda hoje goza de intenso e crescente interesse. Em virtude da diversidade de funções que lhes são atribuídas, o seu estudo reúne pesquisadores das áreas mais variadas como químicos, biólogos, agrônomos, médicos, engenheiros, tecnólogos e nutricionistas. Em relação aos alimentos, pelo menos cinco funções já foram citadas: 1) corante natural responsável pela coloração atraente de muitos alimentos, seja como constituinte natural dos alimentos ou como aditivo; 2) precursor de vitamina A; 3) sequestrador de oxigênio, propriedade que os torna protetores dos lípidos contra a oxidação; 4) inibidor de determinados tipos de câncer; e 5) precursor de compostos voláteis, responsáveis pelo aroma dos alimentos.

BRADLEY & MIN (1992) afirmam que a interação da luz, dos fotossensibilizadores e do oxigênio são a base para a formação do oxigênio singlete. Os pigmentos naturais presentes nos alimentos são conhecidos por ser fotossintetizadores eficientes devido ao seu sistema de ligações duplas conjugadas que facilmente absorve a energia de luz visível. A presença de pequenas quantidades de carotenóides pode ajudar na prevenção da rápida oxidação dos constituintes dos alimentos, seqüestrando a molécula de oxigênio singlete. Isto já foi explicado por NAMIKI (1990), segundo o qual as plantas são expostas à luz visível e ultravioleta, cujas radiações seriam especialmente susceptíveis a danos por oxigênio ativado. Constituintes das plantas, como os carotenóides, agem como antioxidantes contra os radicais livres de oxigênio e as moléculas excitadas.

2.3 - URUCUM

O corante origina-se das sementes do urucum (*Bixa orellana* L.), planta que cresce nas áreas tropicais da América do Sul, Índia e África. A planta é assim nomeada, lembrando Francisco de Orellana, o conquistador, que explorou pela primeira vez o rio Amazonas, em 1541 (PRESTON & RICKARD, 1980; ENGELHARDT et alii, 1988).

VILLELA (1942) afirma que as sementes da planta, conhecida também como urucú (*Bixa orellana* Linn.), encerram uma matéria corante que há muito tempo é empregada em tinturaria e como condimento e corante de certos alimentos. Segundo TESTA (1935), é uma planta nativa na América Tropical e aclimatada no Oriente (Filipinas, Índia e Java).

Segundo ANGELUCCI et alii (1980) e CARVALHO & HEIN (1989), sua ampla distribuição geográfica é responsável por mais de 50 nomes diferentes. No Brasil, é conhecido como urucú, urucum, urucu-uva, urucu-bravo, açafroa e bixa, e por nomes indígenas como ahité, nukirê, bixe e bichá. Na América espanhola, a planta é conhecida como achiote, anoto, achote, onotto, onotillo, roekoe, schirabaeli, koessewee, koesowe, bija, cacicuto, uruca, achiotillo, arnotto, arnolta, roucou, chancaguarica, kuxub, achihuiti, achiti, shambu, huantura, atta, santo domingo, analto e guajachote. Na Espanha é conhecido como bija, na França como roucouyer e o produto como rocou. Na Alemanha como Orleansbaum. Na Itália, Inglaterra e Estados Unidos como annatto, em Angola como kisafu ou diteque, e na Índia como lathan ou kolsewil (GOSE, 1946; SANCHEZ, 1965; ONU, 1988).

AMPIÉE (1956) e VASQUEZ (1988) afirmavam também que a matéria oleaginosa que recobre as sementes do urucum, de cor vermelha brilhante, é muito usada como condimento na América Latina.

Este arbusto, nativo da América Tropical, hoje cresce em

muitos países: Bolívia, Brasil, Ceilão, República Dominicana, Equador, Guyana, Índia, Jamaica, México, Peru e Suriname. Também é produzido em menor escala na África (Angola, Kênia, Nigéria, Tanzânia) e no Pacífico (Filipinas e Hawaii) (SANTOS, 1958; PRESTON & RICKARD, 1980; MÜLLER, 1988; WOOD et alii ,1991).

A planta do urucum pertence à família *Bixaceae* e responde ao nome botânico de *Bixa orellana* L. Pode ser observada como um arbusto grande ou como uma árvore pequena, com 2 a 5 metros de altura, dependendo da região ecológica e da idade da planta. A planta exibe uma variabilidade muito grande de coloração, dos caules verdes, flores brancas e frutos verdes aos caules vermelhos, flores rosas e frutos vermelho-escuros. Os frutos consistem de uma cápsula ou cachopa, coberta de espinhos flexíveis. As cachopas variam em tamanho e aparência, podendo ser arredondadas ou alongadas com extremos pontudos. No interior, estão normalmente divididas em duas valvas, com 10 a 50 pequenas sementes, quase do tamanho das sementes de uva. Existem, ocasionalmente, árvores que produzem cachopas com três valvas que contém mais sementes que o normal. As sementes estão cobertas por uma fina camada resinosa de tons que vão desde o laranja brilhante até o amarelo/vermelho, dos quais o corante natural é obtido (INGRAM & FRANCIS, 1969; PRESTON & RICKARD, 1980; HERNÁNDEZ et alii , 1988).

Segundo VILLELA (1942), tanto o urucum como o corante dele extraído, receberam as denominações de orlean, annatto, terra orleana, rocou, "jaune d'orleans", rocoe, conforme a procedência e o modo de preparação. A matéria corante existe principalmente na parte externa das sementes mas as folhas também poderiam conter uma pequena quantidade de pigmento, segundo o mesmo autor.

GUIMARÃES et alii (1991) afirmam que existem basicamente quatro variedades de urucum cultivadas no Brasil e que possuem cascas de coloração vermelha, verde, branca (amarelo clara) e púrpura, com frutos em formatos que variam do oval ou alongado, bicu-

do e achatado, com presença ou ausência de pilosidade, contendo entre 50 a 70 sementes em frutos bicarpelares e 100 a 110 nos tricarpelares.

No Brasil, o urucum já vem sendo cultivado há vários anos. As regiões com grandes áreas de cultivo se localizam no Norte, no Nordeste e no Sudeste. Os principais Estados produtores são: Acre, Amazonas, Pará, Bahia, Ceará, Paraíba, Piauí, Rio de Janeiro e São Paulo (SANTOS, 1988; AZEVEDO, 1981; LIMA, 1991).

O urucuzeiro é uma planta de cultura pré-colombiana, habitando ecossistemas florestais localizados na América Tropical. Seu cultivo tem aumentado, nos últimos anos, na Amazônia brasileira, notadamente no Estado do Pará, que possui a maior área cultivada e a maior produção da região (FALESI, 1991). Pesquisadores como MEDEIROS (1973), CUNHA et alii (1978) e GUIMARÃES et alii (1991) afirmam que as plantações do norte do Brasil contam com os mais elevados teores.

Em geral, os cultivos de urucum apresentam grande variabilidade genética, causada pela polinização cruzada entre os diversos tipos, que dão origem a uma infinidade de subvariedades com características próprias, completamente diferentes das sementes utilizadas nos plantios (GUIMARÃES et alii, 1991).

Grande parte dos grãos produzidos é de péssima qualidade (baixo teor de bixina), em face da falta de material genético superior e à não adoção de técnicas apropriadas de cultivo, adubação, controle fitossanitário, podas, colheitas, etc. (AVILA, 1982; LIMA, 1991).

2.4 - BIXINA.

2.4.1 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.

Os carotenóides existem na natureza sob a forma mais

estável que é a configuração *trans*. No entanto, algumas formas *cis* podem ocorrer naturalmente, concordando com WEEDON (1971) e GOODWIN (1976), que afirmam que embora muitos tecidos vegetais não contenham poli-*cis*-carotenóides algumas plantas contêm pequenas quantidades. A bixina, tem isômeros *cis* naturais, porque não são formados por estereomutação dos correspondentes carotenóides *trans*.

O mais importante pigmento vermelho presente nas sementes do urucum é o carotenóide oxigenado alfa-bixina, também conhecido como bixina *cis* ou lábil. A fórmula molecular deste composto é mostrada na Tabela 1 e a estrutura química pode ser vista na Figura 1, confirmando que é o éster monometílico de um ácido dicarboxílico que tem nove ligações duplas conjugadas, sendo que uma delas tem a configuração *cis* (DIEMAIR et alii, 1952; LUNDE & ZECHMEISTER, 1955; BENTLEY, 1960; McKEOWN & MARK, 1962; LAURO, 1991; WOOD et alii, 1991).

Tabela 1- Pigmentos carotenóides do urucum.

Nome	Fórmula molecular	Peso molecular
alfa-bixina (<i>cis</i> - ou bixina lábil)	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394
beta-bixina (<i>trans</i> - ou bixina estável)	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	394
alfa-norbixina (<i>cis</i> - ou norbixina lábil)	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	380
beta-norbixina (<i>trans</i> - ou norbixina estável)	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	380
produto amarelo de degradação térmica	C ₁₇ H ₂₀ O ₄	288

Fonte: WOOD et alii (1991).

Segundo WEEDON (1971), a bixina pode ser definida como um diapo-carotenóide. Já DUPAIGNE (1974) e PRESTON & RICKARD (1980) afirmam que o maior carotenóide do extrato do pericarpo é a *cis*-bixina, que é de cor laranja e é insolúvel em óleo vegetal. Este é rapidamente convertido por aquecimento no isômero mais estável *trans*-bixina, que é vermelho e solúvel em óleo, e produtos de degradação, principalmente pigmentos amarelos C₁₇. Segundo estes mesmos autores, a *cis*-bixina alcança mais de 80 % dos carotenóides totais, o que está de acordo com WINDHOLZ et alii (1983) e TONG (1984).

IVERSEN & LAM (citados por PRESTON & RICKARD, 1980) mostraram que a bixina dissolvida em óleo vegetal ou em outros solventes, sofre uma série complexa de isomerizações e degradações quando aquecida à temperatura de extração, conseguindo-se isolar um pigmento amarelo de uma preparação comercial de urucum.

BERSET & MARTY (1986) reportaram que o principal corante é constituído em mais de 70 % pela bixina, o éster monometílico do ácido 9'*cis*-6,6'-diapo carotenodiólico. A bixina natural (*alfa*) na configuração 9' é reconhecida como pouco estável e pode se isomerizar ao longo das operações de extração.

Para FRANCIS (1987), o pigmento presente no urucum é uma mistura de bixina e norbixina. Ambas, normalmente estão presentes na forma *cis* e uma pequena porcentagem delas é mudada à forma *trans*, mais estável sob aquecimento. Um produto de degradação é também produzido por aquecimento. Enquanto que as formas *cis* são avermelhadas, as formas *trans* e os compostos de degradação são amarelados.

WOOD et alii (1991) explicaram que, na extração e processamento do pigmento, vários produtos de rearranjo ou de degradação podem ser formados. Uma cuidadosa hidrólise alcalina da bixina dá formação ao ácido dicarboxílico livre norbixina, que da mesma forma que a bixina, pode existir em ambas as formas *cis* e

trans. Todos estes compostos tem valor como corantes para alimentos e podem estar presentes num extrato ou formulação de urucum, dependendo de como ele tenha sido preparado. Isso poderá determinar os produtos alimentícios em que o urucum pode ser utilizado. A alfa-bixina segundo REITH & GIELEN (1971) é instável à temperatura ambiente, mesmo ao abrigo da luz, escuro, quando na forma de pó ou em clorofórmio. Porém, o composto na forma de pó é estável quando armazenado no escuro a -20°C.

DENDY (1966b) definiu que a bixina natural ou lábil, cristaliza-se em prismas violeta escuros, com ponto de fusão 198°C, com absorção máxima em 524, 489 e 457 nm, em dissulfeto de carbono. Se tratada em solução com traços de iodo, a bixina lábil isomeriza-se para a estável *trans*-bixina, com ponto de fusão 216°C, e máximos em 526, 491 e 457 nm, em dissulfeto de carbono. A isomeria acontece na segunda dupla ligação, contando a partir do grupo carboxílico livre.

O mesmo DENDY (1966b) afirmou que bixina natural tem absorção máxima em 502, 470 e 440 nm em clorofórmio (Figura 2). Da absorbância máxima na região dos 500 nm, a concentração de bixina em clorofórmio pode ser calculada. Uma estimativa da qualidade das preparações de urucum ou das sementes de urucum, pode ser obtida medindo o teor de bixina e comparando-o com o teor total de pigmento (EWING, 1972). Geralmente, a proporção de bixina e teor total de pigmento estão bem acima dos 70 %, exceto no caso dos pigmentos amarelos preparados deliberadamente por esterificação ou por degradação controlada.

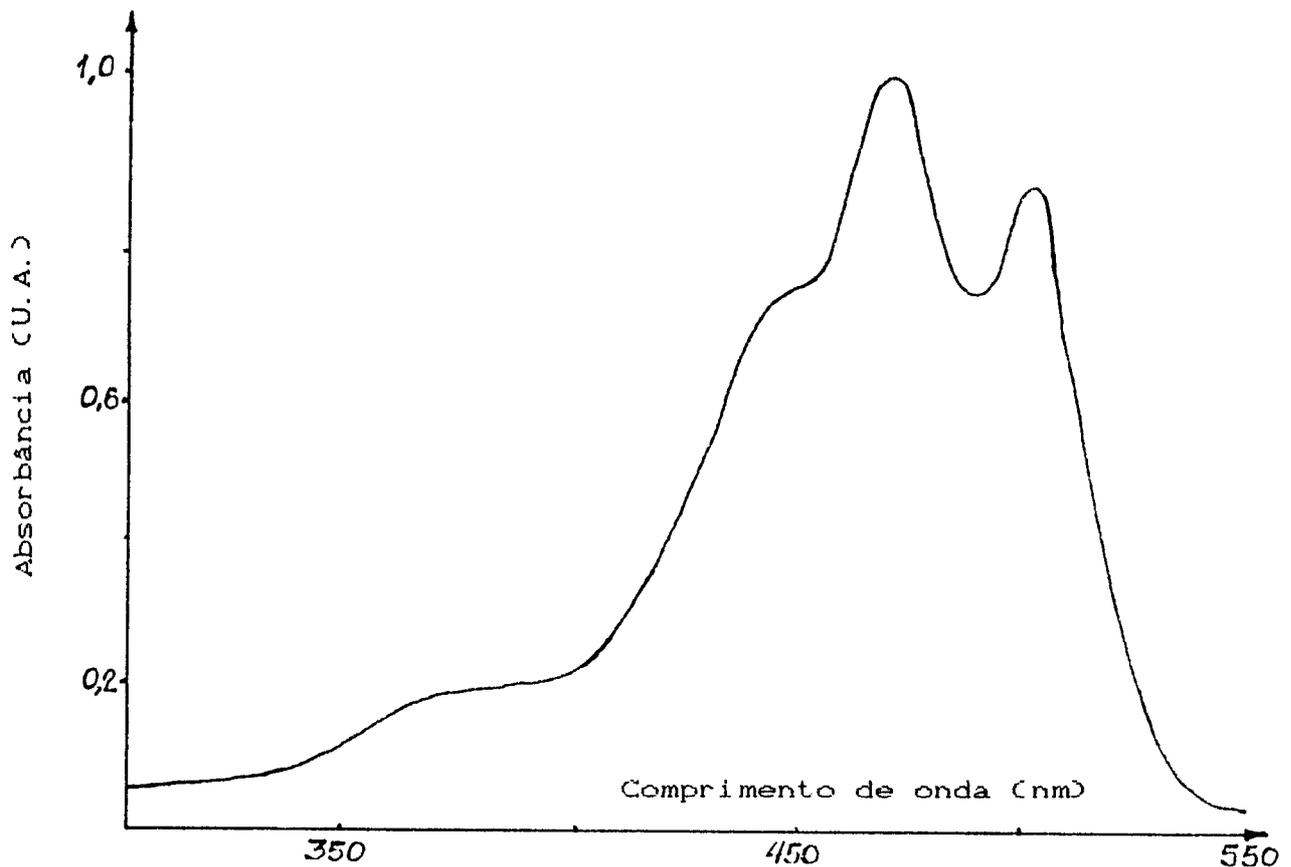


Figura 2- Espectro de absorção da bixina (em clorofórmio).

Fonte: McKEOWN & MARK (1962), BERSET & MARTY (1986).

McKEOWN & MARK (1962) demonstraram que, em clorofórmio, a bixina apresenta picos máximos de absorção a 469-470 e 501-503 nm e que a grande quantidade de pigmentos diferentes presentes nos extratos de sementes de urucum, é explicada pelas reações de degradação e isomerização ocorridas quando se utilizam altas temperaturas na extração.

De acordo com McKEOWN (1965), a estrutura do pigmento amarelo formado pela degradação térmica da bixina é o ácido 13-carbometoxi-4,8-dimetil tridecahexaenóico. O autor também cita a comprovação da estrutura da bixina por meio de ressonância magnética nuclear, com a dupla ligação na forma *cis* localizada no carbono 9.

Deve ser salientado que nem todos os carotenóides atúam como precursores de vitamina A, pois para isso um carotenóide deve ser

dotado de um anel β -ionona não substituído com cadeia lateral poliênica com, pelo menos, onze carbonos. A bixina, como pode ser observado pela estrutura química, não possui atividade provitáminica A (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989; TEE, 1992).

2.4.2 - MÉTODOS DE ANÁLISE.

Em geral, uma das características mais importantes dos carotenóides é seu espectro eletrônico de absorção. Este é uma função do cromóforo, contribuição da cadeia poliênica que é influenciada pela natureza de algumas características e pelo solvente. A determinação do espectro de absorção em diferentes solventes é um dos procedimentos mais importantes na identificação dos carotenóides (DAVIES, 1976).

Existem diferentes maneiras de determinar o conteúdo de pigmento presente tanto nas sementes como no extrato de urucum. O método de McKEOWN & MARK (1962), expressa como % de bixina e envolve extrações repetidas das sementes com clorofórmio. O extrato total é medido e o conteúdo do pigmento calculado com base na absorção de luz do extrato em 501 nm e aplicando o coeficiente de absorção de 2.826; a 1%.

Já outros autores (COLLINS, 1991; WILBERG, 1992; WILBERG & RODRIGUEZ-AMAYA, 1992) manifestaram que para determinar o teor de bixina existente em extratos de urucum, através do método espectrofotométrico, deve-se medir a absorbância a 470 nm e calcular o teor de bixina na amostra, utilizando-se a Lei de Beer e supondo um valor de 2.826 para o coeficiente de absorção da bixina em clorofórmio.

Por isso, segundo WOOD et alii (1991), haveria alguma distorsão das proporções relativas se a bixina e a norbixina estivessem presentes em quantidades comparáveis, devido as suas diferentes absorvidades. Vários comprimentos de onda na faixa dos 400 a 500 nm foram pesquisados. As sensibilidades mais

elevadas obtidas da bixina e da norbixina foram encontradas em 470 nm mas uma resposta adequada foi também obtida em 500 nm, comprimento de onda que parece apresentar baixo potencial para interferência dos absorvedores de menor comprimento de onda.

Os métodos de separação dos carotenóides são cromatográficos e podem ser divididos segundo a técnica utilizada. No caso de carotenóides, devido a sua baixa volatilidade e termolabilidade, os resultados obtidos utilizando cromatografia gasosa não são satisfatórios. Tradicionalmente os pigmentos das sementes do urucum são quantificados em conjunto, através de métodos espectrofotométricos, após extração com solvente apropriado. A maioria dos métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, para a separação dos carotenóides, utiliza colunas de fase reversa, onde ocorrem ligações mais fracas com os pigmentos (WILBERG, 1992; GODOY, 1993).

LUNDE & ZECHMEISTER (1955) obtiveram espectros infravermelhos, para vários carotenóides, incluindo a metilbixina. Considerando os dados obtidos, configurações *cis* ou *trans*, propostas previamente na base dos fenômenos espectrais tem sido confirmadas, outras revisadas.

RONCAGLILO (1961) avaliou técnicas para análise, extração, purificação e concentração de pigmentos lipossolúveis - usualmente adicionados aos alimentos.

Já McKEOWN (1961) e McKEOWN & MARK (1962) descreveram um sistema de cromatografia em papel, usando papel Whatman impregnado com N,N-dimetilformamida a 50 % em acetona. O desenvolvimento é feito com ciclohexano-clorofórmio-N,N-dimetilformamida-ácido acético (85:10:3:2) utilizando fluxo descendente.

RAMAMURTHY & BHALERAO (1964) desenvolveram uma técnica cromatográfica de camada delgada simples para separar e identificar onze pigmentos amarelos para alimentos. As cores de

urucum e curcumina podem ser separadas de outros pigmentos lipossolúveis e hidrossolúveis, quando examinadas, em placas de vidro revestidas com ácido silícico ou sílica gel G com acetato de amila como solvente. Os pigmentos lipossolúveis e hidrossolúveis podem ser apropriadamente separados em placas de vidro revestidas com carbonato de cálcio contendo amido se as placas são tratadas com parafina líquida. A separação dos pigmentos é obtida usando uma mistura solvente de metanol, água e solução de amônia na proporção de 20 + 5 + 1. Esta técnica permite a separação de vários componentes em 15 a 20 minutos.

DENDY (1966a) apresentou um método modificado para determinar o teor de bixina nas preparações de urucum, utilizando cromatografia em camada delgada para separar a bixina, que é medida espectrofotometricamente. O método de separação é rápido e não menos exato que o método por cromatografia em papel.

DENDY (1966b) manifestou que para as provas de cromatografia, placas de vidro são cobertas com uma camada de sílica gel contendo aproximadamente 12 % de sulfato de cálcio como selador. Um volume de 0,2 mL do extrato é aplicado à camada de sílica gel. As placas são eluidas com uma mistura de ácido acético (1 vol.), clorofórmio (50 vol.) e acetona (50 vol.). Uma boa separação é conseguida em 30 minutos a 25°C. A secção de sílica gel contendo a bixina (com Rf 7 aproximadamente) é extraída com uma solução de acetona contendo 2 % de ácido acético em volume.

BAHL (1971) trabalhou com cromatografia em camada delgada, usando sílica gel como adsorvente e empregando clorofórmio-metanol (94:6) para desenvolvimento. O pigmento obtido foi principalmente bixina com poucas impurezas de cor laranja escura que não foram removidas. A purificação poderia ser feita em solução de acetato de etila e diluição com éter de petróleo, que causam a precipitação da bixina pura.

REITH & GIELEN (1981) determinaram o teor de pigmento total

de corante em manteiga, onde alfa-bixina foi o principal corante detectado. Foi utilizada cromatografia em camada delgada para separar os pigmentos em manteiga e queijo. Para manteiga foi utilizada placa de celulose e como eluente ciclohexano-clorofórmio-ácido acético (65:5:1) por 100 a 120 minutos. Para queijo foi utilizada placa de sílica gel e como eluente clorofórmio-etanol-ácido acético (68:2:1) por 225 minutos. Foram determinados os pontos de fusão e os valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ para alfa-bixina, beta-bixina alfa-norbixina, e a estabilidade da alfa-bixina examinada sob diferentes condições.

Segundo MEDEIROS (1973), as sementes de urucum foram submetidas a extração com acetona e o extrato foi submetido a cromatografia em coluna de vidro contendo uma mistura de magnésia ativada e celite 1:3. Cada zona colorida da coluna foi cortada e extraída com éter de petróleo, depois com 1,2-dicloroetano e finalmente com metanol. Cada fração obtida foi cromatografada em placas e calculado o Rf. Segundo LIAAEN-JENSEN (1971), os valores de Rf são de grande uso na comparação direta dos carotenóides. Aqui, os valores de Rf são usados como um dos critérios de identidade. Também foi o espectro de absorção máxima para cada fração usando éter de petróleo, 1,2-dicloroetano e metanol. Os espectros de absorção em luz ultravioleta ou visível revelam o cromóforo.

A FAO/WHO (1976) estabeleceu as especificações para a identificação dos pigmentos dos extratos lipossolúvel e hidrossolúvel da semente de urucum. A identificação é feita por meio de testes de solubilidade, reações coloridas características, espectrofotometria, reação de Carr-Price e cromatografia em camada delgada. Isto também foi definido por WURTZ & TORREBLANCA (1983) e ROUSEFF (1988).

ARIMA et alii (1980) testaram dois métodos de separação dos carotenóides das sementes de urucum, por cromatografia em coluna, utilizando três tipos diferentes de adsorventes. O método mais

conveniente na separação foi a cromatografia de eluição por etapas, com aplicação seqüencial de solventes de polaridade crescente. O adsorvente mais adequado foi a mistura sílica gel-terra diatomácea (1:1). As zonas coloridas foram coletadas separadamente, seu solvente evaporado e cromatografadas em placas com sílica gel. Vários solventes foram testados visando otimizar a separação das manchas. As placas foram observadas sob luz natural e ultravioleta. As manchas separadas foram caracterizadas quanto à cor e ao Rf. Constatou-se que quase todos os carotenóides de urucum sofrem transformações na cor e na intensidade da coloração durante as etapas de separação enquanto outros, em menor quantidade não mostram o mesmo efeito.

TIRIMANNA (1981) comunicou que técnicas cromatográficas de camada delgada bidimensional tem sido usadas no estudo dos pigmentos carotenóides de sementes de urucum. Somando aos dois carotenóides principais (bixina e norbixina), β -caroteno, criptoxantina, luteína, zeaxantina e metilbixina tem sido identificados tentativamente por esta cromatografia. Foram encontrados outros carotenóides não identificados, mas em pequenas quantidades.

SMITH et alii citados por DEGNAN (1991) informaram que o método de cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa foi usado para separar α - e β -bixina, norbixina e metilbixina. Foi usada uma fase móvel de metanol-solução de ácido acético ao 2% (8,7:1,3) a 1 mL/min. Vinte μ L de uma solução diluída de quantidades iguais de norbixina, bixina e metilbixina em dietilformamida-metanol (1:1) foi injetada no cromatógrafo para determinar os tempos de obtenção. FISHER & KOCIS (1987) e CZINKOTAI et alii (1989) realizaram trabalhos similares.

WOOD et alii (1991) relataram uma avaliação dos métodos de ensaio espectrofotométricos e de cromatografia líquida de alta eficiência em sementes de urucum e em extratos comerciais. Um

método desenvolvido pela British Food Manufacturing Industries Research Association (BFMIRA) apresenta um grande avanço sobre os métodos anteriores por ser capaz de separar, em menos de 15 minutos, com detector de comprimento de onda variável, as concentrações relativas dos pigmentos bixinóides que podem ser estimadas na mesma operação.

WILBERG (1992) afirma que para quantificação dos pigmentos individuais, deve-se dispor dos padrões puros. *Cis*-bixina com 90% de pureza, é obtida por extração das sementes de urucum com solvente orgânico apropriado e purificação do extrato resultante, por recristalizações sucessivas.

De acordo com WILBERG & RODRIGUEZ-AMAYA (1992), o método por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou ser menos preciso que o espectrofotométrico na determinação dos carotenóides totais do urucum. Seu uso não deve ser recomendado, a não ser que possa ser aprimorado e fornecer, separadamente, os teores de bixina, de norbixina e de cada um dos componentes amarelos.

A quantificação dos carotenóides, na separação feita por cromatografia líquida de alta eficiência, é realizada espectrofotometricamente e a precisão dos resultados depende dos coeficientes de extinção usados no cálculo das concentrações, considerando que, trabalhando com o mesmo solvente, existem discrepâncias ao respeito (GODOY, 1993).

2.4.3 - EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS CORANTES

Três métodos básicos são comercialmente utilizados para extrair o pigmento das sementes: 1) extração alcalina, que resulta na conversão do carotenóide de uma forma de éster molecular lipossolúvel a hidrossolúvel, forma molecular de ácido carboxílico comumente conhecida como norbixina; 2) extração com óleo, que causa a remoção de bixina e pequenas quantidades de outros

materiais coloridos; 3) extração com solvente, que resulta na forma mais pura do pigmento - a bixina (FREUND et alii, 1988).

Muitos trabalhos têm sido feitos com o intuito de obter bixina pura, utilizando diferentes solventes e diferentes técnicas de extração.

HASSELT (1911) relatou um processo de fermentação primitivo para preparar uma pasta corante de um vermelho vivo, conhecida como "orlean" ou "rocou". Ele citou quatro pesquisadores que trabalharam com uma substância cristalizada. Etti, que emprega para a extração uma mistura de álcool 80 % e soda. Zwick, que prepara a bixina extraíndo o "orlean" com clorofórmio em aparelho de Soxhlet. Por último, Marchlewski & Matejko, que trabalharam e confirmaram os resultados prévios. Estes, seguindo o método de Zwick, extraíram com clorofórmio uma pasta de "orlean", utilizando acetona para a purificação.

KUHN & EHMANN (1929) descreveram uma extração utilizando álcool etílico e posterior cristalização com ácido acético e lavagem com acetato de etila. Após secagem com cloreto de cálcio o rendimento foi de 65-80 % do produto bruto. Foram obtidos prismas violeta escuros que se mostraram fortemente dicrômicos (de azul até vermelho escuro).

BARNETT, Pat. E.U.A. 2,815,287 (1957), estudou um processo contínuo para a extração em óleo da matéria corante das sementes de urucum e estabeleceu um processo para recuperar cristais de bixina, utilizando óleo vegetal a 100°C. A bixina pode ser concentrada por cristalização em uma solução de solvente orgânico, tal como clorofórmio, para produzir bixina pura cristalizada.

PERRET & PARK, Pat. E.U.A. 2,830,908 (1958), trabalharam com a preparação de um novo pigmento por modificação do éster do ácido polienedicarboxílico que se apresenta na natureza como o éster monometílico - bixina. O material inicial pode ser preparado por um ou vários processos convencionais de esterificação

utilizando álcool e bixina, ou formas apropriadas desses compostos.

KOCHER, Pat. E.U.A. 2,831,775 (1958), preparou extratos de urucum com propilenoglicol, na presença de pequenas quantidades de um composto alcalino, onde a proporção da mistura das sementes de urucum foi duas vezes o peso do propilenoglicol. Obtem-se dessa forma uma solução final com pH entre 9,5 e 13,5, estando substancialmente livre da tendência de sedimentação a baixas temperaturas em prolongado período de armazenamento.

BAUERFEIND & BUNNELL, Pat. E.U.A. 2,861,891 (1958), relataram um método para secar extratos de carotenóides que sejam estáveis ao ar e que possam ser dispersados em meio aquoso. Os carotenóides bixina e metilbixina foram dissolvidos em óleo comestível em baixas temperaturas e, posteriormente aquecidos a 100-160°C para formar uma solução supersaturada do carotenóide que foi seca em forma de partículas.

DENDY (1966a) mostra diferentes métodos de extração e preparação do pigmento e derivados. Ele refere-se à extração solvente da seguinte maneira: 1) com óleos comestíveis, onde as sementes são pré-tratadas com água ou vapor, e submetidas a extração com óleo quente ou frio. A solução é filtrada e diluída, padronizada e comercializada para colorir margarina e outras gorduras e óleos. 2) com glicol, os corantes são extraídos com propilenoglicol alcalino (hidróxido de potássio). A solução filtrada e padronizada pode ser usada em gordura e queijo. 3) com solventes voláteis (i) os corantes são extraídos com uma mistura de álcool etílico e tricloroetileno, sendo que depois da extração, os solventes são removidos por destilação, obtendo-se urucum concentrado; (ii) as sementes são submetidas a extração com cetonas, álcoois, ou alcanos clorados. O extrato é concentrado; adiciona-se sulfato de dimetila para esterificar a bixina. A metilbixina é extraída com éter de petróleo.

O mesmo DENDY (1966a) afirmou que as sementes têm que ser submetidas a extração com uma mistura de álcool etílico e tricloroetileno. Os solventes foram removidos por destilação, obtendo-se um extrato concentrado de urucum que pode ser comercializado em pó, livre de umidade.

MONGE (1967) realizou a extração da bixina das sementes de urucum "in natura", usando clorofórmio a 40°C, com forte agitação. Após filtração e concentração a vácuo, obteve cristais de cor violeta escura. Com uma nova diluição, obteve bixina com 100 % de pureza. Também obteve um extrato que é uma mistura dos outros corantes derivados do urucum, de cor vermelha escura, denominado "pasta corante", com 26,3 % dos pigmentos totais referentes a bixina.

BAHL et alii (1971) concluíram que a melhor extração foi feita utilizando acetona ou acetato de etila, aquecendo diretamente as sementes em um balão e decantando o extrato utilizando algodão como filtro. O corante extraído foi convertido no éster metílico utilizando solução metanólica de hidróxido de potássio com sulfato de dimetila. Filtrando os sais, a solução foi concentrada até obter metilbixina lábil cristalina.

A FAO/WHO (1976) estipula especificações para os métodos de produção de extratos de urucum. Um extrato de urucum em óleo comestível, como uma solução em suspensão, pode ser preparado por pré-tratamento do pericarpo com água quente ou vapor, seguido por extração com óleo vegetal ou mono- e diglicerídeos. A extração solvente também é empregada. Extratos aquosos de urucum são obtidos aquecendo o pericarpo, ou o extrato solvente, com uma solução de hidróxido de sódio ou potássio a 70°C ou menos. Depois são levados a ebulição e filtrados.

SCHULTZ, Pat. E.U.A. 4,204,043 (1980), afirmou que o pigmento é extraído misturando as sementes com água contendo uma

ou mais alfa-enzimas (p.ex. poligalacturonase) por um período de tempo e temperatura suficiente para extrair o pigmento. Seguindo este método, a bixina pode ser extraída das sementes com um rendimento muito elevado, considerando que pequenas quantidades da alfa-enzima poligalacturonase são necessárias para produzir o efeito desejado.

BHALKAR & DUBASH (1983) utilizaram vários métodos de extração, tais como solventes orgânicos, carbonato de sódio aquoso, hidróxido de sódio e extração e dispersão em água. Com a mistura solvente de clorofórmio-etanol (25:75 v/v), obtiveram acima de 76 % dos pigmentos totais. Entre os vários métodos, a extração por solventes foi considerada a melhor, coincidindo com RAJAMARAN et alii (1981).

Da mesma maneira, SCHMIDT, Pat. E.U.A. 4,380,553 (1983), trabalhou com um método para obter uma cor avermelhada para usar como tempero. O método envolve a formação de uma pasta de urucum, por precipitação ácida de uma solução alcalina e mistura da pasta com sal para obter o tempero.

Em outro trabalho de SCHMIDT, Pat. E.U.A. 4,548,822 (1985), obteve-se corante de urucum em pó, solúvel em ácidos, envolvendo a mistura de um extrato alcalino de urucum com uma dispersão aquosa de amido dextrinizado e secagem. Também pode ser preparado com um solvente apropriado (acetona, dicloroetileno, hexano, isopropanol, metanol ou cloreto de metileno).

Segundo PRESTON & RICKARD (1980), o pigmento do urucum foi extraído com um solvente apropriado tal como acetona. Depois o extrato pode ser lavado com hexano ou algum outro solvente em que o pigmento seja virtualmente insolúvel para remover impurezas e

odores indesejáveis. Outros solventes testados foram diclorometano, dicloroetano, etanol, éter de petróleo e propano-2-ol. Os principais carotenóides presentes foram *cis*- e *trans*-bixina.

GUIMARÃES et alii (1989) manifestaram que a simples movimentação das sementes de urucum em leito de jorro de ar permite liberar a bixina no fluxo de ar. O material recolhido apresentou cerca de 20 % em massa, obtido por procedimento puramente mecânico.

ENGELHARDT et alii (1988) concluíram que os produtos mais concentrados são obtidos por extração com solventes orgânicos, embora a precipitação por extração inicial em solução aquosa de hidróxido de potássio e logo neutralização produza um produto final bastante concentrado. Para determinar o teor de corante presente, deve-se realizar uma análise espectrofométrica, diluindo os produtos em solvente apropriado (VERGHESE & JOY, 1989).

MURTHI et alii (1989) fizeram uma extração a 120°C por 20 minutos em que a proporção de 1:1 de óleo para sementes é a melhor para extração de bixina partindo de sementes inteiras ou em pó. As sementes de urucum podem ficar de molho por 1 hora, antes da extração a 90°C por 45 minutos com óleos refinados de amendoim. O extrato dá intensidade de cor comparável à maioria dos corantes comerciais ou dos extratos de óleo de ricino. Neste caso, óleos comestíveis como os de amendoim ou de ricino podem ser usados efetivamente para extrair bixina das sementes, por aumento da temperatura de extração a 90°C ou umidecendo as sementes a 10 %, adicionando água antes da extração por contracorrente.

DEGNAN et alii (1991) afirmam que o uso de dióxido de carbono em estado supercrítico, como solvente nas extrações do pigmento das sementes de urucum, tem potencial para impedir a necessidade de se usar solventes orgânicos ou temperaturas elevadas. Neste caso, análises do pigmento das sementes de urucum obtido por extrações com dióxido de carbono supercrítico, mostraram só a presença de alfa e beta-bixina. Só a bixina foi extraída de amostras mistas, consistindo de bixina e norbixina. Nenhum produto de degradação térmica foi detectado nas amostras extraídas, na faixa de temperatura usada. Aumento de temperatura resultou em aumento dos pigmentos/g CO₂ em todas as pressões. Incrementos isotérmicos na pressão não incrementaram a relação pigmento/g CO₂.

CHAO et alii (1991) utilizaram dióxido de carbono supercrítico para extrair os corantes das sementes do urucum, em diferentes pressões e temperaturas. Os resultados da separação cromatográfica em camada delgada em fase reversa, revelaram que os extratos obtidos foram compostos principalmente de bixina, geranilgeraniol e norbixina. O rendimento em pigmentos totais obtido à pressão de extração de 310 bar foi maior do que a 210 bar e 50°C.

WOOD et alii (1991) confirmaram o trabalho de DENDY (1966b), afirmando que a produção de uma formulação de urucum dispersível em água consiste numa suspensão de urucum em propilenoglicol contendo um emulsificante, na qual alfa-bixina é o pigmento predominante. No caso da obtenção em solventes, depois de sua remoção, o extrato pode ser diluído com óleo vegetal comestível, para obter-se uma formulação miscível em gorduras. Alternativamente o extrato pode ser purificado por cristalização repetida, processo que pode render bixina quase pura (90 %). Cuidados devem ser tomados para manter os resíduos dos solventes dentro dos limites aceitáveis. Eles informaram também que as

formulações de urucum hidrossolúvel (requerido, por exemplo, na coloração do queijo) podem ser preparadas por hidrólise alcalina do urucum extraído com solventes, ou por extração direta das sementes inteiras com solução alcalina aquosa, acompanhado por aquecimento controlado, para converter a bixina em norbixina. Em ambos os casos, o produto final é usualmente uma solução aquosa contendo sais de potássio ou sódio de norbixina, na presença de álcali em excesso a 1-2 % m/v. A acidificação do extrato alcalino possibilita a precipitação da norbixina. Isto pode ser mostrado na Figura 3.

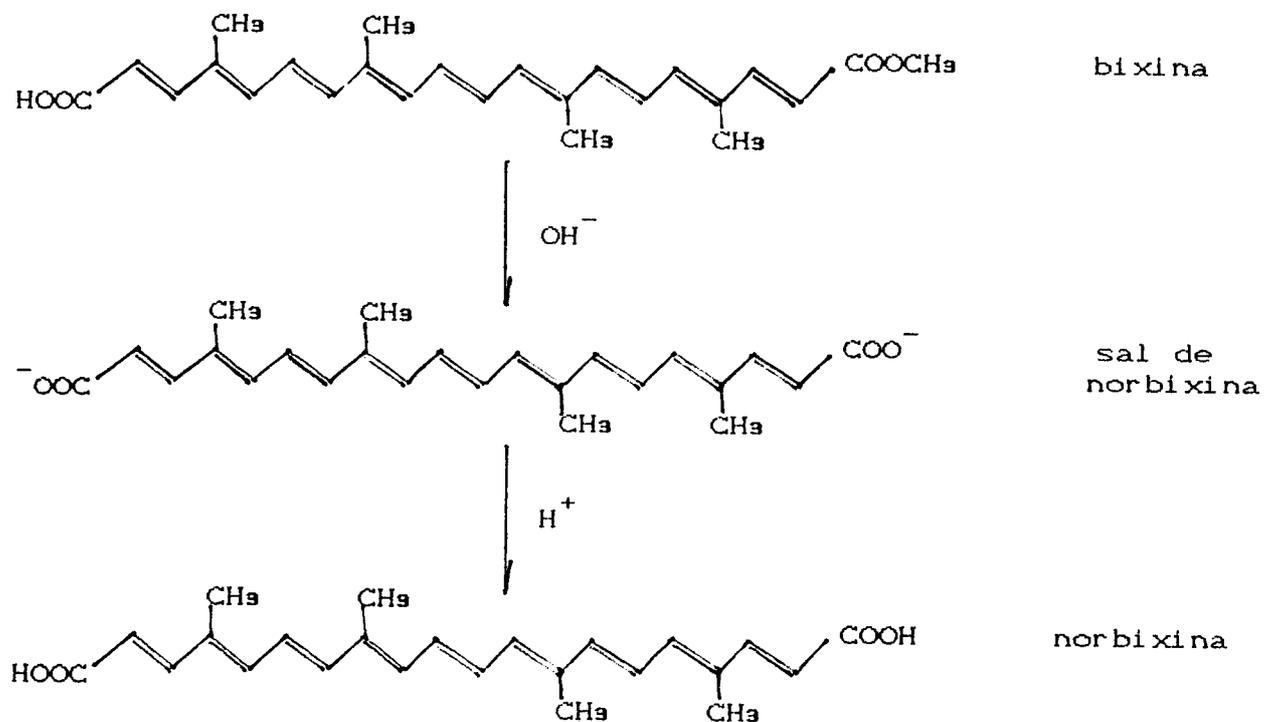


Figura 3- Extração alcalina a partir de sementes de urucum.

Fonte: CARVALHO (1992), WOOD et alii (1991).

2.4.4 - TOXICOLOGIA

INGRAM & FRANCIS (1969) informaram que muitos corantes sintéticos não estão incluídos na lista dos corantes para alimentos permitidos, devido ao seu potencial tóxico. Isto é confirmado por MOLLENHAUER (1990) e HALLAGAN (1991).

Segundo PRESTON & RICKARD (1980), em 1970 a FAO/WHO estabeleceu um índice de ingestão diária aceitável (IDA) temporária de extratos de urucum, de 1,25 mg/kg de peso corpóreo, mas estudos metabólicos dos principais carotenóides presentes no urucum continuaram sendo realizados. Depois de completados os estudos, pode-se afirmar que os pigmentos são satisfatoriamente metabolizados. Foi demonstrado que nos humanos, os pigmentos provenientes de bixina lipossolúvel, suspensão de bixina em óleo e pigmentos de urucum hidrossolúvel podem ser detectados no sangue, dentro de poucas horas após a administração de uma simples dose oral. Eles são absorvidos no intestino pelo sangue e metabolizados pelo fígado.

A FAO/WHO (1976) publicou uma série de estudos toxicológicos do extratos de semente de urucum, onde são apresentados dados sobre a toxicidade aguda em ratos e estudos de curta duração com camundongos, ratos e cachorros. A IDA temporária concorda com aquela citada no parágrafo anterior.

Segundo ENGELHARDT et alii (1988), considerando o fator de que o corante natural de urucum tem sido usado por gerações sem problemas, as pesquisas científicas desenvolvidas durante os últimos 30 anos estabeleceram uma certa segurança ao corante. SEXTON (1991) informou que o urucum é permitido em todos os países do mundo mas PERKIN (1994) recomenda que em nenhum caso, os limites recomendados sejam ultrapassados.

Para SRINIVASULU & MAHAPATRA (1989), nenhuma evidência de carcinogenicidade foi encontrada em todo este tempo. Ingestões de

extratos de urucum, em elevadas dosagens, podem provocar a aparição de sintomas em indivíduos com problemas na pele. A IDA para humanos, estabelecida pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) é de 0,065 mg/kg peso do corpo/dia em bixina. Isto também é informado por ENOSHITA (1986) e CARVALHO (1988).

Para COLLINS (1991), a avaliação toxicológica dos pigmentos do urucum não demonstrou nenhum efeito tóxico e nenhuma evidência de carcinogenicidade. Revisa a situação legislativa comum dentro dos 12 Estados membros da Comunidade Económica Europeia (CEEC), e discute as chances relativas de novas diretrizes para corantes. Dá as especificações que existem no mercado e os regulamentos e processos que definirão as mudanças futuras, quanto aos aspectos legislativos do urucum. Por último, concorda com a IDA definida pelo JECFA (0 - 0,065 mg/kg/dia) mas menciona que outro comité técnico, o SCF (Scientific Committee for Foods, 14th Series 1983), trabalhou com a IDA temporária de 0-2,5 mg/kg/dia de bixina.

Por isso, LIN (1992) manifesta que testes de toxicidade animal são geralmente exigidos para aprovação dos aditivos para alimentos e de cor utilizados em humanos. O objetivo de tais testes seria conhecer qual o potencial do aditivo para causar efeitos tóxicos em humanos e para determinar quais as condições de segurança para uso, que poderiam ser estabelecidas. Segundo o autor, o problema aparece porque a maioria dos laboratórios são inadequados para testar a toxicidade de um novo aditivo em humanos.

2.4.5. ESTABILIDADE

Urucum em pó e em solução aquosa (1,4 %) foram utilizados em estudos de estabilidade (AUSLANDER et alii, 1977). Ambos os sistemas, ácido e básico, demonstraram ser menos estáveis, quando comparados com o corante sintético FDC Vermelho 3.

ENGELHARDT et alii (1988) afirmam que o urucum é muito estável acima de 120°C e, comparado com outros corantes naturais, é relativamente estável à luz. A estabilidade é melhorada consideravelmente em baixas concentrações de oxigênio ou pela presença de antioxidantes nos produtos alimentares. Sendo estável na presença de agentes redutores e oxidantes, o urucum supera algumas das maiores desvantagens dos azo-corantes sintéticos, com elevada reatividade em presença de agentes oxidantes (cloretos e hipocloritos) e agentes redutores (dióxido de enxofre, ácido ascórbico, açúcares invertidos, ácido cítrico e alguns aromatizantes), com redução da cor. Os corantes de urucum não são afetados pelos metais (alumínio, zinco, ferro, estrôncio). Semelhante aos outros carotenóides, o pigmento do urucum é relativamente estável nas diversas operações unitárias incluindo branqueamento, esterilização e congelamento.

É obvio que a cor é um dos fatores importantes que determinam a aceitabilidade dos alimentos. De acordo com KEARSLEY & KATSABOXAKIS (1980) e KEARSLEY & RODRIGUEZ (1981), os corantes naturais são degradados severamente, durante o processamento, enquanto que os corantes sintéticos são mais resistentes às mudanças. Eles estudaram a estabilidade e usos em alimentos de diferentes corantes naturais comparando-os com os corantes sintéticos.

NAJAR et alii (1988) fizeram uma observação sobre a estabilidade dos extratos de urucum em presença de luz e ar, com e sem adição de pró- e antioxidantes. Em geral, todos os resultados apontaram uma estabilidade considerável do urucum à oxidação pelo ar, em meio anidro, mas a uma fraca resistência aos efeitos da luz, que são proporcionais à intensidade da luz. A adição de palmitato de ascorbila mostrou ser um caminho razoável para aumentar a persistência da cor, sob forte iluminação.

2.4.6 - APLICAÇÕES.

O urucum, em geral, é um dos mais importantes corantes

naturais usados na indústria de alimentos. Em volume, na forma de corante, representa cerca de 90 % dos corantes naturais usados no Brasil e 70 % dos corantes naturais usados no mundo (PILLI, 1984). Do total de sementes de urucum industrializadas no Brasil, cerca de 25 % são usadas na fabricação do corante propriamente dito. O restante é usado na fabricação de colorau, condimentos, tempero e ração (GHIRALDINI, 1989).

Os cristais de bixina comercializados como tal apresentam pureza variável, de 50 até 99 %. É comum ser encontrado um produto muito menos puro, na forma de pó de bixina. Os cristais e o pó de bixina são necessários para a produção de soluções corantes com elevado valor tintorial, que não podem ser preparadas diretamente das sementes. As soluções preparadas de cristais, ou pó de bixina, podem ter aplicações em alimentos ou não (ANAND, 1983; NEWSOME, 1986; DZIEZAK, 1987).

Segundo INGRAM & FRANCIS (1969), o urucum pode ser usado sem restrições no mundo dos corantes para produtos de laticínios, sendo normalmente usado em queijos e margarina. A solução alcalina de urucum (principalmente norbixina) é usada quase que exclusivamente no mercado de processamento de queijo e salsicha (HABAJ, 1969).

De acordo com TIRIMANNA (1981), o principal uso do urucum é como corante alimentar para manteiga, queijo, margarina, óleos comestíveis e para fabricação de sorvetes. Há outros usos sugeridos que requerem apropriada verificação científica, tais como propriedades como repelente de insetos, capacidade de proteger a pele contra os raios solares e propriedades medicinais e cosméticas (ALMEIDA, 1931).

ANAND (1983) indicou que o urucum é usado principalmente na indústria de alimentos, embora sua sensibilidade à luz e a presença de substâncias como o dióxido de enxofre são os maiores

limitantes para o seu uso em produtos alimentares e bebidas. A relativa instabilidade dos materiais corantes sintéticos nos produtos de laticínios, tais como o queijo, faz com que o urucum seja preferido pelos fabricantes de tais produtos (SEXTON, 1991). Embora em alguns países o urucum seja usado também para colorir margarina há competição com outros corantes, tais como curcumina, beta-caroteno e pigmentos sintéticos. A margarina, em alguns países, precisa conter legalmente níveis específicos de vitamina A. O beta-caroteno é um precursor de vitamina A mas apresenta dificuldades práticas no uso. Por isso, é fácil usar urucum com a vitamina A adicionada. O fato é que o beta-caroteno continua a ser usado na margarina, embora seja mais caro que a combinação de urucum e vitamina A. Fora da indústria de alimentos, os corantes do urucum são usados pela indústria de cosméticos em produtos como batons e preparações como protetor solar e tingimento de couro. Em alguns países em desenvolvimento é usado como corante para tecidos e como ingrediente em cera para pisos, graxa para sapatos, esmalte para unhas, laqueador para bronze, óleo para cabelo e tinta para madeira (ANAND, 1983; OPE/PNUD, 1987).

ENGELHARDT et alii (1988) indicam que como o urucum existe em ambas as formas, lipo- e hidrossolúvel, o corante pode ser usado em um vasto número de produtos alimentares. O urucum lipossolúvel foi um dos primeiros corantes usados para colorir manteiga e margarina (MARCUS, 1956), dando à manteiga cor uniforme. Uma dosagem típica em margarina é 5 mg bixina/kg mas, em algumas margarinas pouco calóricas, a dosagem pode chegar até 10 mg bixina /kg. O urucum pode ser aplicado vantajosamente em óleos e gorduras alimentares diferentes da manteiga e margarina, como em sobremesas com óleo de coco. Inclui também produtos de padaria, nos quais a boa estabilidade do urucum ao calor é vantajosa. Em geral, corantes de urucum emulsificados podem ser vantajosos em produtos como queijo processado, marzipan, sorvetes, sopas, e produtos de laticínios. O urucum emulsificado estável, mais ácido, tem aplicações em bebidas leves, sucos, licores, geléias

transparentes e sobremesas gelatinosas. Tradicionalmente, o urucum solúvel em água tem sido usado para colorir queijo. Como o urucum hidrossolúvel básico não é fortemente ácido (precipitação acima de 7), não é normalmente usado em soluções claramente ácidas como sucos sem polpa e bebidas. Algumas aplicações atuais do corante de urucum hidrossolúvel, incluem molhos, pudins, molho de tomate, catchup, sobremesas de leite, saladas, chá, recheios de sobremesas à base de chocolate e comida para animais.

Para CARVALHO (1988), na forma de corante para alimentos, o corante de urucum compete com outros carotenóides e corantes artificiais. A natureza exata e a extensão dessa competição variam com o produto e com o país. A substituição ao beta-caroteno esbarra na atividade vitamínica deste produto, que é usado simultaneamente como corante e como substituto da vitamina A.

CHAO et alii (1991) manifesta que a indústria de alimentos tem usado os dois maiores componentes da cor do extrato, a bixina lipossolúvel e a norbixina hidrossolúvel, para obter tons que vão do amarelo ao vermelho, a uma variedade de produtos tais como manteiga, margarina, óleo de milho e sobremesas. Nessas aplicações, seu uso é mais econômico que o beta-caroteno. O uso do extrato lipossolúvel tem incrementado, porque muitos corantes alimentares solúveis em óleo não estão muito bem certificados (CARAYA et alii, 1977). A aplicação comercial de tais pigmentos também pode ser estendida para colorir alimentos extrudados.

As vezes, o pigmento de urucum é misturado com outros corantes para produzir variados tons de cor. Por exemplo, o pigmento vermelho do urucum pode ser misturado com curcumina. A mistura pode ser suspensa em óleo vegetal para produzir um corante apropriado para colorir certos tipos de óleos comestíveis, manteiga e cremes para saladas e sobremesas (ANAND, 1983; MARTINS, 1993).

É importante observar a afirmação de BAUERNFEIND et alii (1971), que os principais componentes das preparações de urucum são ácidos carboxílicos, todos sensíveis ao pH, com significado prático só em alimentos com baixo pH, nos quais a cor pode mudar até rosa.

2.5 - EMULSÕES DE CORANTES

2.5.1 - GENERALIDADES

A conversão de carotenóides cristalinos, com características de solubilidade altamente insatisfatórias, em preparações dispersíveis em água é um problema. BAUERNFEIND et alii (1971) afirmou que, usando carotenóides puros cristalinos é possível preparar carotenóides dispersíveis em água por emulsificação de soluções oleosas, mas a pobre solubilidade dos carotenóides em óleos limita tais emulsões a baixos níveis de potencia. Altas concentrações são obtidas aquecendo o óleo a quase 100°C. A emulsão obtida pode ser usada em líquido ou a seco. Além da aplicação de calor, é possível aumentar a concentração, usando um solvente adequado. Tais solventes podem incluir: óleo de laranja, ésteres de ácidos diterpenos como ésteres do ácido abiético, acetoglicerídeos (glicerídeos de ácidos graxos parcialmente acetilados) ou, então, álcoois aromáticos ou seus derivados.

2.5.2 - SOLUBILIDADE E SISTEMA HLB

Segundo FREUND et alii (1988), o urucum purificado extraído com solventes, pode ser especialmente processado para produzir diferentes emulsões corantes, que poderiam ser adicionadas diretamente a produtos com base aquosa ou oleosa. Dependendo das condições de processamento usadas, um corante em emulsão pode conter apenas bixina ou uma mistura de bixina e norbixina. Os emulsificantes usados incluem propilenoglicol,

polissorbato 80 e monoglicéridios.

Segundo BECHER & YUDENFREUND (1978) há variedade de agentes emulsificantes disponíveis no mercado. Dentro dessa ampla variação, a seleção de um ou mais emulsificantes, que atuem adequadamente para cada caso não é uma tarefa fácil. Com a finalidade de economizar tempo na seleção de emulsificantes, foi introduzido um esquema sistemático de seleção dos poucos emulsificantes adequados para uma aplicação específica. Esse método recebeu o nome de "sistema HLB", ou seja, "balanço hidrófilo-lipófilo". A função do sistema HLB é dar um número ao ingrediente, ou combinação de ingredientes que se deseja emulsificar e escolher um emulsificante que tenha o mesmo número. O HLB de um emulsificante é um número empiricamente definido que expressa a relação entre o grupo hidrófilo (afinidade com a água, ou polar) e o grupo lipófilo (afinidade com o óleo, ou não polar). Um emulsificante com carácter lipófilo tem um número de HLB baixo (abaixo de 9,0) e um hidrófilo um número de HLB alto (acima de 11,0).

Existe uma correlação bem definida entre a solubilidade de um emulsificante e seu comportamento. Usam-se emulsificantes "solúveis em água" quando se deseja obter um produto final de "características aquosas", ou seja, de fácil diluição em água (emulsão O/A). Caso contrário, um emulsificante "solúvel em óleo" é usado para obter um produto final com "características oleosas", ou seja, de fácil diluição em óleo (emulsão A/O) (BECHER & YUDENFREUND, 1978).

2.5.3. ESTABILIDADE

Para ENGELHARDT et alii (1988), os produtos mais concentrados são obtidos por extração, usando solventes orgânicos, embora a precipitação por extração, com hidróxido de potássio aquoso produza um produto final inteiramente concentrado. Utilizando

emulsificantes e estabilizantes específicos, os corantes podem ser incorporados dentro de produtos especiais para usos em tipos específicos de alimentos, como queijo processado e bebidas leves.

Ross et alii, citados por BECHER & YUDENFREUND (1978), mostraram que a estabilidade da emulsão pode estar relacionada com as propriedades mútuas de dilatação entre as várias fases da emulsão. Embora o número HLB não seja propriamente um índice "per si" da estabilidade de uma emulsão, a condição de estabilidade máxima para um sistema definido está usualmente associado a um valor particular. Consequentemente, a variação do coeficiente de dilatação em um sistema particular óleo-água poderia ser uma função do HLB, e a condição de estabilidade máxima poderia estar associada com o valor negativo (não dilatação) do coeficiente de dilatação. Observando o comportamento do coeficiente de dilatação do sistema óleo em água (O/A), a estabilidade máxima usualmente acontece em um HLB correspondente a um coeficiente de dilatação levemente negativo.

O Cremophor RH 40 é um solubilizante e emulsificante que contém, como componente principal, hidróxi-estearato de glicerina-polietilenoglicol. O valor HLB está compreendido entre 14 e 16. Com o Cremophor RH 40 podem-se preparar soluções aquosas de vitaminas lipossolúveis A, D, E e K. O aroma e o sabor fracos deste solubilizante constituem uma vantagem neste tipo de aplicação. Já o Tween 80 ou monooleato de sorbitana polioxietileno, muito usado na indústria de alimentos em geral, é um álcool polioxietileno de tipo não iônico, cujo valor HLB situa-se entre 15,0 e 15,8, segundo BECHER & YUDENFREUND (1978).

2.6 - ADSORÇÃO DE ÁGUA POR PRODUTOS DESIDRATADOS

2.6.1 - SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO

Microencapsulação por desidratação envolve duas operações

unitárias: emulsificação e secagem. Secagem por atomização é um dos métodos mais comumente usados para encapsulação na indústria de alimentos, devido a sua simplicidade e economia (BEATUS et alii, 1985; ZILBERBOIM et alii, 1986).

Microencapsulação é uma técnica em que gotas de líquido, partículas ou borbulhas de gás, de um material corante são envolvidas em uma película contínua de um polímero - o material de parede. A microencapsulação tem inúmeras aplicações nos processamentos químicos e tem encontrado uso considerável na indústria de alimentos, para proteger coberturas de aromas, sabores, vitaminas e outros ingredientes sensíveis. Essa técnica é um método comum para converter materiais líquidos em uma forma sólida ou em pó, mais prática; protege o material corante encobrando-o e aumentando sua vida de prateleira (ZILBERBOIM et alii, 1986).

Microencapsulação tem sido aplicada em variados campos industriais tais como farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos. Sua potencialidade para a indústria de alimentos e os processos específicos utilizados para este propósito são discutidos porque o principal problema é a seleção restrita dos materiais de parede, amplamente limitada a polímeros naturais como gomas vegetais, dextrinas, proteínas, açúcares, e outros (polímeros sintéticos e solventes orgânicos são desprezados por considerações de toxicidade). A secagem por atomização é uma técnica de processamento altamente praticável neste contexto. O material de alimentação seria uma emulsão em que a fase dispersa é o material a ser encapsulado e a fase contínua é a solução do material de parede: a água é evaporada e o polímero forma uma matriz seca, onde o material corante fica embebido (BEATUS et alii, 1985).

2.6.2 - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE

A relação de equilíbrio entre um componente presente em

ambas as fases (sólida e gasosa) pode ser representada por vários tipos de curvas. No caso da água, tem-se a relação entre a atividade de água (Aa), o teor de umidade do produto e a temperatura. Segundo Multon & Bizot, citados por ARANA & ITURBE (1988), a afinidade entre os produtos alimentícios e a água está representada pelas isotermas de sorção, onde cada ponto sobre estas curvas corresponde a um estado de equilíbrio.

Para LABUZA (1980), uma isoterma de adsorção representa a relação quantitativa entre a atividade de água de um alimento e seu teor de umidade a temperatura constante, sendo que a atividade de água é definida por:

$$Aa = \frac{p}{Po} = \frac{UR}{100}$$

onde : Aa = atividade de água do produto

p = pressão de vapor da água do produto

Po = pressão de vapor da água pura para a mesma temperatura

UR = umidade relativa de equilíbrio do produto

Para KIMURA & MAEDA (1993), cada alimento possui uma determinada curva de umidade em função da atividade de água, a qual é construída numa temperatura constante e, portanto, denominada "isoterma de adsorção de umidade".

Segundo JARDIM (1987), as isotermas dos alimentos são obtidas à temperatura constante por vários métodos, um dos quais, o método dos dessecadores, que consiste na exposição de uma pequena amostra do produto alimentício a várias atmosferas de umidade relativa constante. Depois que o equilíbrio é atingido, o teor de umidade pode ser determinado gravimetricamente, ou por outros métodos.

2.6.3 - VIDA-DE-PRATELEIRA E ESTABILIDADE

TEIXEIRA NETO et alii (1991) afirmam que a vida-de-prate-

leira de um produto é o tempo em que ele pode ser conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc., sofrendo pequenas mas bem estabelecidas alterações que são até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente. Os melhores processos de conservação de alimentos não conseguem evitar que ocorram certas transformações nos mesmos em função do tempo (ROCKLAND & NISHI, 1980). Assim, determinações da vida-de-prateleira, ajudada pelo conhecimento da cinética das reações que neles ocorrem, torna-se de fundamental importância para os produtores de alimentos, assim como também para as autoridades sanitárias e grupos que defendem os interesses dos consumidores. A cinética das reações analisa os principais parâmetros que afetam a velocidade de uma reação e estabelece relações quantitativas entre causa e efeito, permitindo comparações.

Para realizar estudos de vida-de-prateleira é essencial que se tenha condições de armazenar amostras de produto em condições de temperatura e umidade relativa controladas. Nos testes acelerados de vida-de-prateleira trabalha-se geralmente com variações de temperatura e/ou umidade, que são aumentadas em relação ao padrão normal, acelerando as reações. Obtendo-se os valores cinéticos da reação é possível então estimar-se a vida-de-prateleira (TEIXEIRA NETO et alii, 1991).

2.6.4. UMIDADE RELATIVA DE EQUILÍBRIO

A determinação da umidade é um dos métodos mais importantes e mais amplamente utilizados no controle de produtos alimentícios. A perda ou absorção de umidade, por parte do produto, na atmosfera que o envolve é função da pressão de vapor da água no alimento e da barreira do sistema da embalagem (ROCKLAND & NISHI, 1980;

KIMURA & MAEDA, 1993).

O conhecimento dos teores de umidade inicial e de equilíbrio, bem como a correta determinação de uma isoterma de adsorção, são informações essenciais na escolha de uma embalagem que ofereça ao produto o período máximo de vida útil, em função da permeabilidade ao vapor de água do filme que o acondicionará. A umidade relativa de equilíbrio de um produto é aquela em que o produto nem absorve nem cede umidade (TEIXEIRA NETO et alii, 1991).

A umidade crítica de um alimento desidratado é a umidade correspondente ao ponto do início da aglomeração do produto ("caking") e pode ser identificada dentro do traçado da isoterma de adsorção de umidade, para saber até que umidade um produto pode suportar, sem sofrer alteração de sua estrutura. A umidade crítica em produtos com baixo teor de umidade define a embalagem mais adequada visando manter as características físicas do produto o máximo tempo (MADI et alii, 1979; LABUZA, 1980; KIMURA & MAEDA, 1993).

Para CARVALHO et alii (1993), materiais de embalagem com taxa de permeabilidade ao oxigênio de até $42 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$, a 25°C , conferiram adequada proteção a um corante sólido de urucum contendo inicialmente 31,36% de bixina, durante um ano de estocagem a 30°C e 90% de umidade relativa, na ausência de luz. Eles recomendaram o uso de estruturas co-extrudadas ou laminadas de poliamida (PA) e polietileno de baixa densidade (PABD). Além disso, pigmentando a embalagem, pode-se criar barreira à luz para proteger o corante durante o transporte, manuseio ou armazenamento em ambiente iluminado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL

Foi utilizado extrato de urucum (*Bixa orellana* L.), denominado extrato-base, obtido em laboratório e caracterizado de sementes do urucueiro, normalmente usadas pela indústria de alimentos, adquiridas no comércio em São Paulo. Para fins comparativos dos rendimentos de purificação, também foram utilizadas as sementes de urucum "in natura", diretamente no processamento.

Os solventes utilizados foram da marca MERCK, para análise.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

3.2.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIXINA DAS SEMENTES DE URUCUM

Foi utilizada a técnica desenvolvida pelo Tropical Products Institute (TPI), mencionada por WOOD et alii (1991), pela qual 10 g de sementes inteiras são transferidas para funil de decantação com 250 mL, e submetidas a extração com 5 porções sucessivas (100, 80, 30, 20 e 10 mL) de clorofórmio agitadas vigorosamente durante 10 minutos. O extrato é transferido por meio de funil contendo lã de vidro para balão volumétrico de 250 mL e o volume é completado com clorofórmio. Toma-se uma alíquota (1 mL) da solução para balão volumétrico de 100 mL e completa-se o volume com clorofórmio. Mediu-se a absorbância a 470 nm e calcula-se o teor de bixina da amostra utilizando-se a Lei de Beer e o valor de $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2.826$.

3.2.2 - OBTENÇÃO DO EXTRATO-BASE DE URUCUM

O extrato-base de urucum foi obtido em laboratório e todas as extrações foram realizadas em duplicata. Foi analisado o teor de bixina e calculado o rendimento de extração e a recuperação da bixina. Os resultados foram expressos em porcentagem, calculado

com base no teor inicial de bixina presente nas sementes de urucum.

O extrato-base foi colocado em frasco de vidro e armazenado sob congelamento a $-12 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, para uso durante as etapas posteriores do trabalho.

3.2.2.1 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIXINA DO EXTRATO-BASE

A quantificação da bixina presente no extrato-base foi baseada na Lei de Beer, de acordo com o método recomendado pela FAO/WHO (1982), utilizando o comprimento de onda de máxima absorção de 470 nm. A porcentagem total de carotenóides foi expressa em bixina considerando o valor de absortividade $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2.826$. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro UV/VIS de marca BECKMAN modelo DU-70, usando clorofórmio como branco. Os resultados foram expressos em porcentagem de bixina presente no extrato-base de urucum.

3.2.2.2. DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

Foi utilizado o método descrito pela AOAC (1990), pela qual as amostras são colocadas em placas de Petri, levadas à estufa a 105°C por 3 horas e pesadas até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de umidade presente no extrato-base.

3.2.3 - OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A EXTRAÇÃO

3.2.3.1 - TIPO DE SOLVENTE

Foi utilizado como solvente de extração o álcool etílico, baseado nas pesquisas prévias desenvolvidas por PERRET & PARK na Pat. E.U.A. 2,830,908 (1958), DENDY (1966a), PRESTON & RICKARD (1980), BHALKAR & DUBASH (1983) e ENGELHARDT et alii (1988), trabalhando-se com tempo de extração de duas horas.

Foram utilizados para a extração 300 gramas de sementes

de urucum inteiras e 600 mL de álcool etílico, na proporção peso-volume de 1:2, em balão de boca esmerilhada de 1.000 mL e submetendo à agitação por duas horas, à temperatura ambiente, em agitador FISATOM modelo 713, 2000 rpm. Após este tempo a solução colorida foi separada das sementes utilizando uma peneira de malha 100.

O material corante foi separado do solvente por decantação, colocando a solução por quatro horas em uma proveta de vidro de 1.000 mL. Depois, o sólido precipitado foi submetido à centrifugação utilizando uma centrífuga de bancada marca FANEM a 3.000 rpm (ou 1.950 g) e o corante sólido submetido à secagem em secador com circulação forçada de ar.

3.2.3.2 - TEOR DE BIXINA DAS SEMENTES

Considerando que as sementes de urucum não apresentam teores semelhantes de bixina, foram testadas amostras diferentes para observar a relação existente entre o teor de bixina das sementes e dos extratos.

3.2.3.3 - TEMPO DE SECAGEM DO EXTRATO-BASE

Para determinar o tempo máximo que o sólido centrifugado poderia ser submetido à secagem sem sofrer alterações na quantidade de bixina final, trabalhou-se com um secador com circulação forçada de ar a 90°C por 3, 6, 9, 12 e 15 minutos, colocando as amostras em placas de Petri, depois analisando-as espectrofotometricamente e comparando os resultados com o tempo zero.

3.2.3.4 - RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

Foi calculado o rendimento da extração, relacionando o peso do extrato-base seco e o peso das sementes utilizadas no processamento. Este dado foi comparado com a quantidade de bixina do extrato-base, para observar a relação entre estes dois valores.

O aumento na pureza dos extratos foi obtido relacionando a porcentagem de bixina obtida na extração com a porcentagem de bixina presente nas sementes de urucum.

3.2.4 - IDENTIFICAÇÃO DOS CORANTES

Foram comparados a bixina e seus derivados presentes nos extratos-base de urucum obtidos nos itens anteriores, com cristais de bixina de alta pureza, conforme DENDY (1966a), FRANCIS (1965) e TAKAHASHI (1987).

Foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada baseadas em DENDY (1966b), utilizando soluções em clorofórmio dos extratos-base cromatografados em placas com sílica gel G60 MERCK. Os cromatogramas foram desenvolvidos com uma mistura de clorofórmio-acetona-ácido acético (50:50:1). O ácido acético é colocado para aumentar a polaridade da mistura dos solventes (RAMAMURTHY & BHALERAO, 1964; FRANCIS, 1965). Depois foi aplicada solução de iodo ao 0,5% em clorofórmio como revelador, para observar a presença de outros compostos não visíveis normalmente e determinou-se o Rf.

Também foi feita a varredura dos extratos-base obtidos, usando o espectrofotômetro BECKMAN DU-70, com absorvância entre 0,0 e 1,0 e comprimento de onda entre 400 e 550 nm, uma vez que a bixina apresenta absorção máxima nessa faixa de comprimento de onda.

3.3 - PURIFICAÇÃO DA BIXINA

3.3.1 - TESTES PRELIMINARES

Foram feitos testes preliminares para observar o comportamento de diferentes solventes referentes à eficiência na purificação do extrato-base de urucum.

3.3.1.1 - UTILIZANDO SOMENTE UM SOLVENTE

Num balão de vidro foram colocados 0,5 g de extrato-base de urucum seco, 20 mL de solvente e agitação por 5 minutos, à temperatura ambiente. O conteúdo do balão foi filtrado sobre papel e o solvente com o corante extraído foi recolhido em um balão de vidro e submetido a evaporação em um evaporador rotatório marca Büchi a 39°C sob vácuo de 60 cm Hg, até eliminar a totalidade do solvente.

Foi tomada uma alíquota do corante e determinado o teor de bixina. Os solventes utilizados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2- Solventes utilizados para purificar o extrato-base de urucum.

Solvente	Índice de polaridade	°T de ebulição (°C)
Água	9,0	100,0
Acetato de etila	4,3	77,1
Acetona	5,4	56,1
Alcool butílico	3,9	117,0
Alcool isopropílico	4,3	82,3
Éter de petróleo	2,0	30,0 - 60,0
Éter etílico	2,9	34,6
Etileno glicol	5,4	197,6
Hexano	0,0	66,0 - 71,0
Isocetano	-0,4	99,3
Metanol	6,6	64,7
Metil-etil-cetona	4,5	79,6
Propileno glicol		188,2
Tricloroetileno	3,7	86,7

Fonte: SNYDER (1974), WINDHOLZ et alii (1983).

3.3.1.2 - UTILIZANDO MISTURA DE SOLVENTES

Seguindo a mesma técnica do item 3.3.1.1, foram utilizadas também misturas de acetona com hexano, metil etil cetona, tricloroetileno e isopropanol na proporção 1:1.

A través das quantidades de bixina nos corantes purificados, as duas misturas de melhor comportamento e reavaliadas nas proporções 3:1, 1:1 e 1:3.

3.3.2 - PURIFICAÇÃO POR CRISTALIZAÇÃO

Depois de fazer uma análise preliminar do comportamento de diferentes solventes e misturas de solventes com o extrato-base de urucum (item 3.2.2), foi definida a metodologia para obter a purificação por cristalização da bixina.

Para isto, foram colocados 2 gramas de extrato-base de urucum seco e 20 mL de solvente em balão de vidro, que foi submetido à agitação, por 10 minutos a 40°C. Posteriormente, o material foi filtrado em papel de filtro e o líquido resultante concentrado em evaporador rotatório até 10mL e, a seguir, colocado em tubos de vidro com tampa de rosca vedada com teflon, para submeter os extratos-base de urucum a cristalização pelo frio, trabalhando com temperaturas de -15°C, em banho refrigerado.

3.3.2.1 - UTILIZANDO MISTURAS DE SOLVENTES

Depois de observar o comportamento das diferentes misturas de solventes testadas no item 3.3.1.2, escolheram-se as que extraíram com maior eficiência o material corante para encontrar os solventes que melhor conseguiram purificar a bixina por cristalização a frio, segundo 3.3.2.

3.3.2.2 - PROPORÇÃO DA MISTURA DOS SOLVENTES

Depois de medir o teor de bixina presente nos cristais de bixina, escolheram-se as misturas com melhor comportamento e mudaram-se as proporções entre os solventes. Foi utilizada a mesma técnica do item 3.3.2 com misturas de solventes acetona-tricloroetileno, metanol-acetato de etila, acetona-isopropanol e metanol-acetona em proporções de 3:1, 1:1 e 1:3.

3.3.2.3 - RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO POR CRISTALIZAÇÃO

Para definir qual o melhor processamento para a obtenção de bixina purificada por cristalização, foi calculado o rendimento bruto da purificação para as diferentes misturas de solventes, considerando que:

$$\text{Rendimento de purificação} = \frac{\text{Peso do extrato purificado}}{\text{Peso do extrato-base urucum}} \times 100$$

Também foram tomados os diferentes resíduos obtidos das purificações efetuadas no item 3.3.2.2 e analisados quanto ao teor de bixina no resíduo, visando definir as misturas mais eficientes.

3.3.3 - PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

Os métodos de purificação por precipitação utilizados foram baseados nas experiências desenvolvidas por BERSET & MARTY (1986) e TADAMASA & YASUDA, Pat. 60,184,566 do JAPÃO (1988).

3.3.3.1 - A PARTIR DO EXTRATO-BASE DE URUCUM

Para otimizar os parâmetros a utilizar na purificação do extrato-base de urucum (item 3.2.2), todas as purificações foram realizadas em duplicata, determinando a porcentagem de bixina no extrato e calculando porcentualmente o rendimento de purificação e a recuperação de bixina. A porcentagem de recuperação de bixina, por purificação, foi calculada com base no teor inicial de bixina nas sementes de urucum.

As amostras de extrato purificado de bixina foram armazenadas a $-12 \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro, para uso durante as etapas posteriores do trabalho relacionadas com a estabilidade do produto.

3.3.3.1.1 - SOLVENTE ADEQUADO

Para escolher o solvente adequado para fazer a

purificação do extrato-base de urucum, trabalhou-se com diferentes misturas de solventes, todas elas com pontos azeotrópicos baixos para impedir a degradação térmica da bixina e considerando os respectivos índices de polaridade, segundo a Tabela 3.

Tabela 3- Misturas de solventes testadas e respectivas temperaturas de ebulição.

Misturas testadas	Proporção recomendada	Temperatura de ebulição (°C)
Etanol:tricloroetileno:água	41,2:38,4:20,4	44,4
Etanol:acetato de etila:água	12,4:60,1:27,5	70,3
Tricloroetileno:metanol	66:34	60,2
Acetato de etila:água	95:5	34,2
Isopropanol:acetato de etila	23:77	74,8
Metanol:acetato de etila	19:81	54,0
Etanol:tricloroetileno	28:72	70,9

Fonte: MORITA & ASSUMPÇÃO (1983).

Foram testadas também as misturas de solventes que melhor se comportaram na purificação da bixina dos itens 3.3.1 e 3.3.2.

Os testes visaram obter o melhor comportamento das misturas de solventes com a água e sua solubilização com o extrato-base de urucum. Para isto, tentou-se a diluição de 2 gramas de extrato-base de urucum em 100 mL do solvente escolhido, para depois completar a mistura com igual quantidade de água.

3.3.3.1.2 - RELAÇÃO EXTRATO-BASE: SOLVENTE

A determinação da proporção ótima entre extrato-base de urucum e solvente (peso-volume) foi realizada em função da utilização da mistura acetona-isopropanol (1:1) como solvente de extração. A temperatura de extração foi fixada em 40°C, mas posteriormente foi feito um estudo de otimização da temperatura de extração.

Utilizaram-se para a extração 2 gramas de extrato-base de urucum e 100 mL da mistura acetona-isopropanol (1:50), colocados em balão de boca esmerilhada, acoplado a um condensador para refluxo e mantidos à temperatura fixada por 30 minutos. O material foi filtrado em papel de filtro e depois adicionada a mesma quantidade de água sob agitação. Após homogenizar, foi induzida a mudança do estado de equilíbrio da solução, diminuindo o pH até precipitar a bixina, utilizando ácido clorídrico 1,0 N.

O material resultante foi decantado em um funil de separação por 4 horas e o sólido assim separado colocado em placas de Petri, para secar em capela à temperatura ambiente.

Similarmente, foram realizadas extrações com 5 g do extrato de urucum e 100, 200, 300, 400 e 500 mL de acetona-isopropanol, sendo a relação entre extrato-base e solvente 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 e 1:100.

3.3.3.1.3 - TEMPERATURA DE PURIFICAÇÃO

Considerando que a bixina é um carotenóide, a temperatura de extração tem um papel muito importante na quantidade final de bixina presente nos extratos purificados. Foram testadas as temperaturas de 30, 35, 40, 50 e 65°C, para a mistura de solventes acetona-isopropanol, com agitação por 30 minutos, comparando-as com a purificação feita à temperatura ambiente. O método foi o mesmo utilizado no item 3.3.3.1.2.

3.3.3.1.4 - PURIFICAÇÕES SUCESSIVAS

Do resíduo das purificações desenvolvidas no item 3.3.1.1.2 foram realizadas novas purificações, utilizando a mistura acetona-isopropanol como solvente trabalhando, desta vez, tanto com proporções como tempo menores. O método foi o mesmo utilizado no item 3.3.3.1.2 e as condições de trabalho são

mostradas na Tabela 4.

Tabela 4- Condições de trabalho utilizadas para estudo do efeito das purificações sucessivas da bixina.

Nº extração	Proporção solvente-extrato	Tempo de purificação (minutos)
1a.	80:1	30
2a.	40:1	20
3a.	20:1	10

3.3.3.1.5 - MUDANÇA DO pH

Para conseguir a precipitação mais eficiente da bixina no líquido filtrado, foi testado o momento mais oportuno para adicionar ácido clorídrico 1,0 N e diminuir o pH da mistura de solvente.

Trabalhou-se com duas metodologias; depois de ter filtrado o material resultante da extração com a mistura acetona-isopropanol.

Método A

líquido filtrado --> adição de água --> mudança de pH

Método B

líquido filtrado --> mudança de pH --> adição de água

3.3.3.1.6 - RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

Para observar a relação entre a quantidade de bixina purificada e o rendimento obtido na purificação, foram feitos os cálculos baseados no seguinte:

$$\text{Rendimento bruto} = \frac{\text{peso do extrato purificado seco}}{\text{peso do extrato-base urucum seco}} \times 100$$

$$\text{Rendimento real} = \frac{\text{peso do extrato purificado seco}}{\text{peso real da bixina}} \times 100$$

Em que:

$$\left(\begin{array}{l} \text{peso real} \\ \text{da bixina} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{l} \text{peso extrato-base} \\ \text{de urucum seco} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{l} \% \text{ bixina extrato-base} \\ \text{de urucum seco} \end{array} \right)$$

3.3.3.1.7 - INCREMENTO DA PUREZA NA PRECIPITAÇÃO

Foram feitos os cálculos para analisar o aumento de pureza obtido nas experiências, a partir do extrato-base de urucum E2, com 65,5 % de bixina, aplicando:

$$\text{Incremento da pureza} = \frac{\% \text{ bixina do extrato purificado seco}}{\% \text{ bixina do extrato-base urucum seco}}$$

3.3.3.2 - A PARTIR DE SEMENTES DE URUCUM

3.3.3.2.1 - MÉTODO ALCALINO

Este método foi idealizado baseado nos conceitos de AUSLANDER et alii (1977) e a Pat. 60,184,566 do JAPÃO (1988), desenvolvida por Tadamasa & Yasuda.

A metodologia de purificação inclui a remoção, sob agitação, dos materiais corantes das sementes de urucum com agitação por 2 horas, à temperatura ambiente, utilizando uma solução de água em álcool etílico (1:4) contendo de 0,2 até 0,6% de hidróxido de sódio. Após a filtração, misturou-se o líquido com uma solução diluída de ácido sulfúrico a 10% até pH 7, para precipitar o corante.

Finalmente, o corante foi submetido a secagem em corrente de ar à temperatura ambiente e moagem em almofariz. O extrato assim obtido foi armazenado a $-12 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.3.3.2.2 - MÉTODO ÁCIDO

Depois de ter determinado os melhores parâmetros tanto para a obtenção do extrato-base de urucum como para a purificação por precipitação, em função da mudança do pH, esses efeitos foram estudados diretamente nas sementes.

Foram colocados 100 gramas de semente de urucum em balão de vidro e 1.000 mL da mistura de solventes acetona-isopropanol (1:1) e agitação por 2 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente o material foi filtrado em papel de filtro e adicionada a mesma quantidade de água, sob agitação. Após homogenizar, foi induzida a mudança de pH até precipitar a bixina, utilizando ácido clorídrico 1,0 N.

O material resultante foi decantado em funil de separação por 4 horas e o sólido, assim separado, colocado em placas de Petri para secar em capela à temperatura ambiente e armazenado a $-12 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.4 - CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS

3.4.1 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIXINA

A quantificação da bixina no extrato purificado foi baseada na Lei de Beer, de acordo com o método recomendado pela FAO/WHO (1982), já descrito no item 3.2.2.1.

3.4.2. ESPECTROFOTOMETRIA

A quantificação da bixina presente e as varreduras dos espectros dos extratos purificados, foram feitas utilizando um espectrofotômetro UV/VIS Beckman, modelo DU-70 usando clorofórmio como testemunha, trabalhando na faixa de absorbância de 0,0 a 1,2, entre 300 e 550 nm.

3.4.3 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As análises por cromatografia em camada delgada baseadas no método descrito por DENDY (1966a), foram realizadas utilizando placas cobertas de camada de sílica gel G60 MERCK. A fase móvel foi uma mistura de clorofórmio-acetona-ácido acético (50:50:1) colocada numa cuba de vidro, onde as placas contendo o corante foram mergulhadas por 30 minutos, à temperatura ambiente.

3.4.4 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Foi obtida utilizando um cromatógrafo líquido Varian, modelo 5000, equipado com detector de arranjo de diodos Shimadzu, modelo SPD-M6A, acoplado a um sistema de dados Acer modelo 915V e uma impressora NEC modelo P6300. Foi usada uma coluna Lichrocart LichroSpher, modelo RP-18, com partículas de 5 μm , com 125 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro com fase móvel metanol-ácido acético 2% v/v (80:20), desenvolvida isocraticamente, taxa de vazão de 1,0 mL/min e utilizando detector de arranjo de diodos entre 300 e 600 nm.

Antes de aplicar os extratos dissolvidos em clorofórmio no cromatógrafo líquido, estes foram filtrados em sistema Millipore empregando membrana FHLP, com porosidade de 0,5 μm e desgasados em ultrasonificador.

3.5 - OBTENÇÃO DE UM EXTRATO HIDROMISCÍVEL DE BIXINA

3.5.1 - SOLUBILIDADE DO EXTRATO

Para obter uma emulsão estável de fácil diluição em água, apropriada para a secagem por atomização, utilizou-se um emulsificante solúvel em água. A faixa de HLB (balanço hidrófilo-lipófilo) para emulsificantes de tipo emulsão óleo/água é entre 8-18. Foram comparados dois emulsificantes dentro destas características: Tween 80 e Cremophor RH-40.

Quantidades diferentes de emulsificante (1, 3, 5 e 8 mL) foram misturadas com água destilada (99, 97, 95 e 92 mL) e 1 g de extrato purificado de bixina por precipitação a partir do extrato-base de urucum, utilizando um agitador a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ até diluir. Depois foram colocados 10 mL da solução num balão volumétrico de 100 mL e completou-se com clorofórmio. Mediu-se a absorbância a 470 nm e calculou-se o teor de bixina na amostra.

Para medir a solubilidade da emulsão, 20 mL da solução formada foram centrifugados por 5 minutos a 3.000 rpm e o teor de bixina no líquido sobrenadante foi determinado espectrofotometricamente.

3.5.2 - PROCEDIMENTO PARA SECAGEM DO EXTRATO HIDROMISCÍVEL

O método utilizado para obter o extrato hidromiscível de bixina, foi baseado nos métodos apresentados por BEATUS et alii (1985) e ZILBERBOIM et alii (1986).

Foi preparada uma emulsão por homogeneização do extrato purificado de bixina (item 3.3.3.1), obtido por precipitação a partir do extrato-base de urucum, contendo um emulsificante na solução de água e maltodextrina, utilizando um emulsificador de alta velocidade de marca FISATOM a 60°C por 1 hora. A emulsão foi secada por atomização num "spray-dryer" Niro Atomizer. As condições de secagem foram as seguintes: temperatura do ar de entrada 185°C , temperatura do ar de saída $65-75^\circ\text{C}$, tempo de alimentação 13-15 kg de água evaporada/hora.

O material seco foi colocado em frasco de vidro e armazenado no escuro sob congelamento a $-12 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.6 - UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS E HIDROMISCÍVEL EM FORMULAÇÃO ALIMENTÍCIA

Para observar o comportamento dos extratos de urucum obtidos

em laboratório, estes foram utilizados para preparar a fórmula de um refresco comercial de tangerina.

Os extratos utilizados para completar a formulação foram de dois tipos: extrato purificado de bixina obtido por precipitação (item 3.3.3.1) e extrato hidromiscível de bixina obtido por atomização (item 3.5).

A formulação utilizada para completar com 400 ml de água foi a seguinte (em gramas):

<u>Ingredientes</u>	
. extrato corante	4,00
. fosfato de cálcio tribássico	0,12
. ácido cítrico	1,60
. citrato de sódio	0,12
. aroma de tangerina	1,20
. açúcar comercial	51,20

Estas formulações foram posteriormente utilizadas para avaliar o efeito da luz na estabilidade da bixina, no item 3.7.1.

3.7 - ESTABILIDADE DA BIXINA

A variação da absorbância, em função do tempo de exposição, foi o parâmetro usado para medir a estabilidade da bixina. A partir da variação da absorbância das amostras, quantificou-se a variação, em função do tempo de exposição, do teor de bixina dos extratos e seus respectivos espectros de absorção (conforme o item 3.2.2.1).

3.7.1 - EFEITO DA LUZ

Para medir a estabilidade à luz dos extratos de bixina obtidos, foi utilizada uma formulação para o preparo de refresco

comercial de tangerina, apresentada no item 3.6, comparando o comportamento de dois tipos de refresco: um, preparado com extrato purificado de bixina obtido por precipitação (item 3.3.3.1) e o outro, com extrato hidromiscível de bixina obtido por atomização (item 3.5).

Foi analisada a absorbância apresentada pelo refresco logo após o preparo (tempo zero) e colocado 10 mL em tubos de ensaio de 20 mL com tampa rosqueada e vedados com teflon. Do total de tubos, a metade foi estocada no escuro e a outra metade exposta a uma lâmpada fluorescente de 15 W Osram, modelo Day Light, colocada a 15 cm dos tubos. A lâmpada forneceu luminosidade de 900 lux, correspondente a um nível padrão de iluminação de exposição no comércio.

Os tubos permaneceram inclinados em relação à fonte de luz, tiveram suas posições trocadas diariamente e foram protegidos de qualquer outra fonte de luz e mudanças de temperatura. Foram retiradas amostras, em duplicata, para determinação do espectro de absorção e leitura de absorbância a 470 nm nos tempos de 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15, 21 e 30 dias.

A Tabela 5 resume as condições experimentais no estudo da estabilidade em relação à luz.

Tabela 5- Condições experimentais no estudo da estabilidade da bixina em relação à luz.

Corante usado no refresco	Teor inicial de bixina (%)	Temperatura (25 ± 2°C)	pH do refresco	Luminosidade
EPB	0,2434	25	2,91	luz
EPB	0,2434	25	2,91	escuro
EHB	0,2601	25	3,16	luz
EHB	0,2601	25	3,16	escuro

onde EPB = extrato purificado de bixina.

EHB = extrato hidromiscível de bixina.

3.7.2 - EFEITO DA TEMPERATURA

Os testes foram realizados com diferentes extratos purificados de urucum, utilizando estufa de laboratório à temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$, em dois grupos diferenciados de trabalho.

3.7.2.1 - UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO PELO MÉTODO ALCALINO

Placas de Petri receberam 0,1 g de extrato purificado pelo método alcalino obtido a partir de sementes (item 3.3.3.2.1) sendo tampadas para evitar contaminação e perda de material. Após a leitura inicial de absorbância segundo o item 3.4.1 (tempo zero), as placas contendo o extrato foram colocadas em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$. Depois foram retiradas, em duplicata, nos tempos de 2, 4, 8 e 12 horas e colocadas em dessecadores. A seguir, foram feitas as leituras da absorbância (segundo o item 3.4.1) e a determinação dos espectros de absorção (segundo o item 3.4.2). As condições de trabalho são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6- Concentração de bixina dos extratos alcalinos e tempo de exposição utilizados no estudo do efeito da temperatura na estabilidade.

Extrato tipo	NaOH (%)	Concentração de bixina (%)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tempo de exposição na estufa (horas)
A	0,2	69,53	105	2, 4, 8 e 12
B	0,3	73,35	105	2, 4, 8 e 12
C	0,4	51,91	105	2, 4, 8 e 12
D	0,5	50,80	105	2, 4, 8 e 12
E	0,6	40,87	105	2, 4, 8 e 12

3.7.2.2 - UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO PELO MÉTODO ÁCIDO

Trabalhou-se com placas de Petri, que receberam 0,1 g de amostras do extrato purificado de bixina (item 3.3.3.1), obtido às temperaturas de extração de 35 e 40°C , porque foram os que

apresentaram a maior concentração de bixina. As placas foram tampadas para evitar contaminação e perda de material. Após a leitura inicial de absorvância segundo o item 3.4.1 (tempo zero), as placas contendo o extrato foram colocadas em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$. Depois foram retiradas, em duplicata, nos tempos de 8, 16 e 24 horas, repetindo o mesmo procedimento do item anterior para ler a absorvância (segundo item 3.4.1) e determinar os espectros de absorção (segundo o item 3.4.2). A Tabela 7 mostra as condições experimentais utilizadas.

Tabela 7- Concentração de bixina dos extratos ácidos e tempo de exposição utilizados no estudo de efeito da temperatura na estabilidade.

Extrato tipo *	Concentração de bixina (%)	Temperatura trabalho ($^\circ\text{C}$)	Tempo de exposição na estufa (horas)
EPB40	90,9	105	8, 16 e 24
EPB35	94,7	105	8, 16 e 24

* EPB = extratos purificados de bixina obtidos a 40 e 35°C .

3.7.3. DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Para determinar a umidade crítica do extrato foram determinadas as isotermas de adsorção pelo método dos dessecadores, descrito por MADI et alii (1979) e JARDIM (1987). O conhecimento desses dados é importante no planejamento futuro de embalagens, principalmente para produtos com baixo teor de umidade.

Trabalhou-se com duas amostras: extrato purificado de bixina obtido a partir de extrato-base de urucum (item 3.3.3.1) e extrato de bixina hidromiscível obtido por atomização (item 3.5). Soluções de ácido sulfúrico em água foram usadas para o controle da umidade relativa, preparadas segundo BRAY (1970) e mostradas na Tabela 8.

Foi colocado um grama de amostra numa placa de vidro de 5 cm de diâmetro, de modo a formar uma fina camada no fundo, secando as amostras em estufa a 105°C até peso constante. As placas, em duplicata, foram colocadas nos dessecadores com umidade relativa conhecida, sob vácuo a 40 cm Hg e 25°C. As placas foram pesadas a cada 2 dias, durante 12 dias. Com base nesse peso, foi calculada a umidade do produto em base seca e feito gráfico de umidade do produto (g H₂O/100 g amostra seca).

TABELA 8- Relação entre as amostras de extrato e as soluções de ácido sulfúrico preparadas para controlar a umidade relativa do meio.

Nº amostra	H ₂ SO ₄ (% em peso)	Umidade relativa a 25°C
1	60	16,24
2	50	34,98
3	40	56,50
4	30	75,15
5	25	82,37
6	20	88,08
7	15	92,36
8	10	98,09

Fonte: BRAY (1970).

3.7.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variações de concentração de bixina em extratos purificados, em função do tempo de reação, obtidas conforme apresentado nos itens 3.3.3.1, 3.7.1 e 3.7.2 foram submetidas a análise de variância.

Estudou-se a relação funcional entre o tempo de tratamento e o teor de bixina e, sempre que possível, confrontaram-se os coeficientes angulares das retas de regressão linear pelo teste de Tukey, ao nível de erro de 5%.

3.7.5. CÁLCULO DAS CONSTANTES DE VELOCIDADE DE REAÇÃO (K) E TEMPO DE MEIA VIDA ($t_{1/2}$)

Os valores das constantes de velocidade das reações (K) foram calculados a partir das variações de concentração de bixina em extratos purificados de bixina, em função do tempo de reação, obtidas dos estudos apresentados nos itens 3.7.1 e 3.7.2.

Segundo TEIXEIRA NETO et alii (1991), os valores de K foram determinados utilizando-se a equação 1, para cinética de 1° ordem.

$$-\ln \left(\frac{C}{C_0} \right) = Kt \quad (\text{eq. 1})$$

Onde:

- C = concentração final de bixina
- C₀ = concentração inicial de bixina
- t = tempo de reação

Do gráfico $-\ln C$ em função do tempo de reação obtem-se uma reta cuja inclinação representa a constante de velocidade da reação.

Os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) foram calculados utilizando a equação 2.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \quad (\text{eq. 2})$$

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - MATERIAL UTILIZADO

O material utilizado foi extrato de urucum obtido a partir de sementes do urucueiro, denominado extrato-base. A quantidade de bixina obtida em duas amostras de sementes de urucum, expressa em porcentagem, foi de 1,9 e 2,4, respectivamente.

A diferença poderia ser explicada por fatores como a variedade da cultura, a procedência da amostra, a forma de secagem das sementes e até o tempo de armazenamento a que foram submetidas, que influenciam a quantidade de bixina da amostra.

O teor de bixina na variedade brasileira de urucum, utilizada no presente trabalho, está em conformidade com os dados de literatura, podendo ser comparado às variedades peruanas de maiores teores (ONU, 1988).

4.2 - TESTES PRELIMINARES PARA EXTRAÇÃO DE BIXINA

4.2.1 - OBTENÇÃO DO EXTRATO-BASE

No preparo do extrato-base de urucum, as sementes foram colocadas em um balão de vidro para facilitar o atrito e submetidas a agitação com álcool etílico. Testes preliminares mostraram que a proporção indicada de 2:1 (álcool etílico-sementes, v/p) era suficiente para produzir abrasão entre as sementes e facilitar a separação da película externa de bixina que as recobrem (GUIMARÃES et alii, 1983; ENGELHARDT et alii, 1988).

Tanto a precipitação como a centrifugação permitiram separar as fases líquida da sólida, que continha o pigmento a extrair. Como o calor poderia afetar negativamente a obtenção da bixina e gerar um pigmento amarelo de degradação (McKEOWN, 1965),

preferiu-se realizar uma secagem rápida em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 90°C, pois testes preliminares não demonstraram influência na estrutura deste carotenóide.

O álcool etílico foi selecionado para obter o extrato-base de urucum pela facilidade de sua obtenção e baixo custo no Brasil, quando comparado com outros solventes (LIMA, 1976).

Segundo o CODEX (1984), em alimentos pode ser utilizado um número restrito de solventes. A natureza dos solventes utilizados foi analisada segundo DENDY (1966b) e PRESTON & RICKARD (1980).

BHALKAR & DUBASH (1983) utilizaram clorofórmio como solvente para extrair os pigmentos totais das sementes de urucum. O rendimento foi elevado embora tenha sido calculado em relação aos pigmentos totais, como também trabalharam McKEOWN & MARK (1962). De acordo com autores como INGRAM & FRANCIS (1969) e PRESTON & RICKARD (1980), é importante a avaliação do rendimento de extração em relação à bixina e não aos pigmentos totais, uma vez que o poder tintorial do urucum é baseado no teor do princípio ativo corante, que é a bixina. Além disso, o clorofórmio não está incluído na listagem de solventes que podem ser utilizados na indústria de alimentos (CODEX, 1984).

Os resultados da obtenção do extrato-base de urucum em função do tempo de secagem (item 3.2.3.3), são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9- Obtenção de extrato-base de urucum em função do tempo de secagem.

Amostra N°	Temperatura de secagem (°C)	Tempo de secagem (min)	Teor de bixina apresentado (%)
1	90	3	37,8
2	90	6	24,5
3	90	9	24,4
4	90	12	24,4
5	90	15	24,1

O comportamento das extrações utilizando diferente tempo de secagem, indica que a partir de 6 minutos o teor de bixina teve uma queda brusca. Como o material corante antes da secagem encontra-se com umidade muito elevada, faz-se necessário aplicar uma leve secagem as amostras, que posteriormente serão colocadas numa capela para completar a secagem à temperatura ambiente. Por isto, secagem do extrato-base de urucum a 90°C por tempo maior que 3 minutos, apresentou efeito destrutivo na bixina, degradando-a.

A Tabela 10 mostra o teor de bixina e a umidade presentes no extrato-base de urucum. Pode-se observar que existe uma ampla diferença entre os teores de bixina determinados nos extratos-base, os quais foram de 34,4 e 60,5%, com umidade de 8,2 e 7,6 %, respectivamente.

Tabela 10- Teor de bixina e umidade no extrato-base de urucum.

Amostra	Bixina(%)	Umidade(%)
E1	34,4	8,2
E2	60,5	7,6

E1 = amostra 1; E2 = amostra 2.

De acordo com INGRAM & FRANCIS (1969), o transporte das sementes para comercialização deveria ser o mais rápido possível porque o conteúdo do corante é destruído pela exposição à luz e o prolongado armazenamento. Afirmam também que, estoques antigos ou armazenados por longo tempo são menos valiosos que sementes frescas.

Os resultados anteriores podem ser confirmados ao analisar a Tabela 11, que faz uma comparação do conteúdo de bixina presente nas sementes com o teor de bixina que apresentou o extrato-base,

onde se observou que a amostra 2 com 2,35% de bixina nas sementes e 65,47 % de bixina no extrato-base foi a que mostrou a melhor extração, obtendo-se um aumento na pureza de 27,86 vezes.

Tabela 11- Relação entre o teor de bixina presente nas sementes e no extrato-base de urucum, o rendimento apresentado e o incremento na pureza da extração.

Amostra	Bixina nas sementes(%)	Bixina no extrato-base seco(%)	Rendimento extração (%) *	Incremento na pureza **
1	1,9	37,5	5,2	20,0
2	2,4	65,5	4,3	27,9

* Rendimento da extração = (peso extr-base seco / peso sementes) x 100

** Incremento na pureza = % bixina extr-base seco / % bixina sementes

Pelo grande número de duplas ligações na molécula, os carotenóides são bastante susceptíveis à isomerização e oxidação, sofrendo perdas durante o processamento e na estocagem. Mesmo em tratamentos térmicos brandos, pode ocorrer isomerização dos carotenóides, resultando na perda de cor (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989).

Quando se observa o processo desenvolvido, comparando com a literatura (McKEOWN, 1962; McKEOWN, 1963; McKEOWN, 1965), onde se confirma a formação de um pigmento amarelo de degradação pela utilização de elevada temperatura no processamento, poderia-se supor que ao não ser utilizado calor na extração do pigmento, a bixina presente nas sementes não teria sua estrutura destruída ou modificada.

Pode-se verificar que o aumento da quantidade de bixina do extrato diminuiu o rendimento da extração (de 5,2 para 4,3 %, respectivamente). A camada externa das sementes contém majoritariamente celulose e taninos, além de pequenas quantidades de resina e óleos essenciais.

4.2.2 - IDENTIFICAÇÃO DA BIXINA NO EXTRATO-BASE DE URUCUM

Ao cromatografar em placas de sílica gel as soluções de extrato-base de urucum (0,01g/mL) contendo 37,5 e 65,5 % de bixina, para as amostras E1 e E2 respectivamente, estas apresentaram 3 manchas diferentes, conforme mostrado na Figura 4.

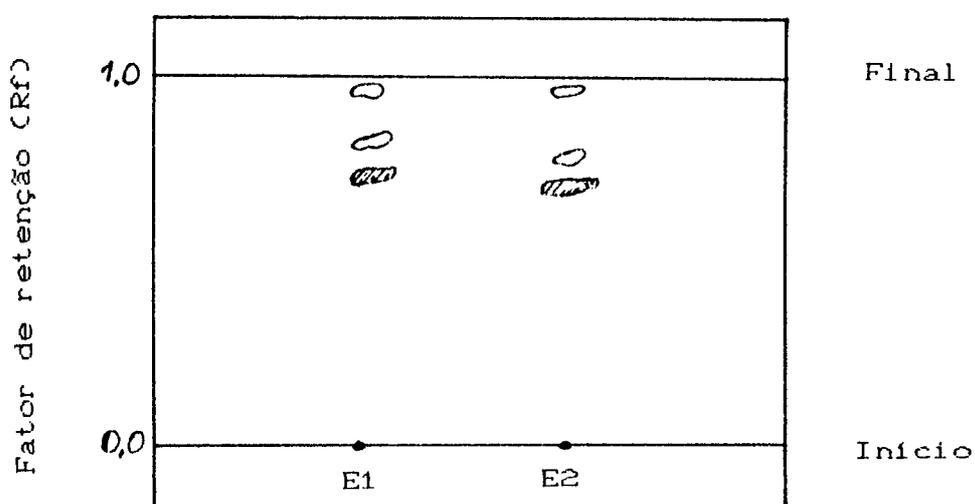


Figura 4- Cromatografia de camada delgada apresentada pelos extratos-base de urucum.

Rf da amostra E1: A (0,77); B (0,82); C (0,95)

Rf da amostra E2: A (0,75); B (0,78); C (0,95)

Nos dois casos, as manchas B e C tiveram coloração amarelo-pálida e a A teve coloração amarelo-alaranjada. Segundo DENDY (1966a), o Rf da bixina é de 0,7 e apresenta-se com uma coloração mais intensa. Isto posteriormente foi confirmado observando o comportamento de uma outra amostra com alta pureza, considerada

como amostra padrão. Os Rf obtidos nas amostras, independentes da concentração de bixina, indicam que a mancha A corresponde à bixina e as outras duas manchas devem corresponder à norbixina e ao pigmento amarelo de degradação. Os resultados também concordam com o publicado por TAKAHASHI (1987), que diz que um extrato lipossolúvel de urucum produz 3 a 4 manchas vermelhas ou amarelas. Depois de analisa-las, foi aplicada solução de iodo ao 0,5% em clorofórmio como revelador, mas não houve revelação de outras manchas. PRESTON & RICKARD (1980) afirmam que a cromatografia em camada delgada é usada para isolar e identificar rapidamente os principais componentes nas preparações comerciais de urucum.

A Figura 5 mostra o espectro de absorção apresentado pelos extratos-base de urucum obtidos, sendo similar ao encontrado na bibliografia. Utilizando clorofórmio como solvente, os extratos apresentaram 2 picos máximos de absorção a 469-470 e 501-503 nm. Isto foi confirmado, observando a curva 2, que a 470 nm deu 0,77 de absorbância ou 65,5% de bixina, em comparação com a curva 1, com 0,43 de absorbância ou 37,5% de bixina.

4.3 - PURIFICAÇÃO DA BIXINA

Pesquisadores como DAVIES (1976), afirmam que como os carotenóides tem uma ampla distribuição natural e se apresentam em diferentes variedades e tipos, nenhum método de purificação pode ser dito como universalmente aplicável e adotado como uma técnica padrão.

4.3.1 - EFEITO DO SOLVENTE

Os resultados obtidos, depois de fazer os testes preliminares, para observar o comportamento de diferentes solventes com o extrato-base de urucum, obtido no item 4.2.1, com 37,5% de bixina, são mostrados na Tabela 12.

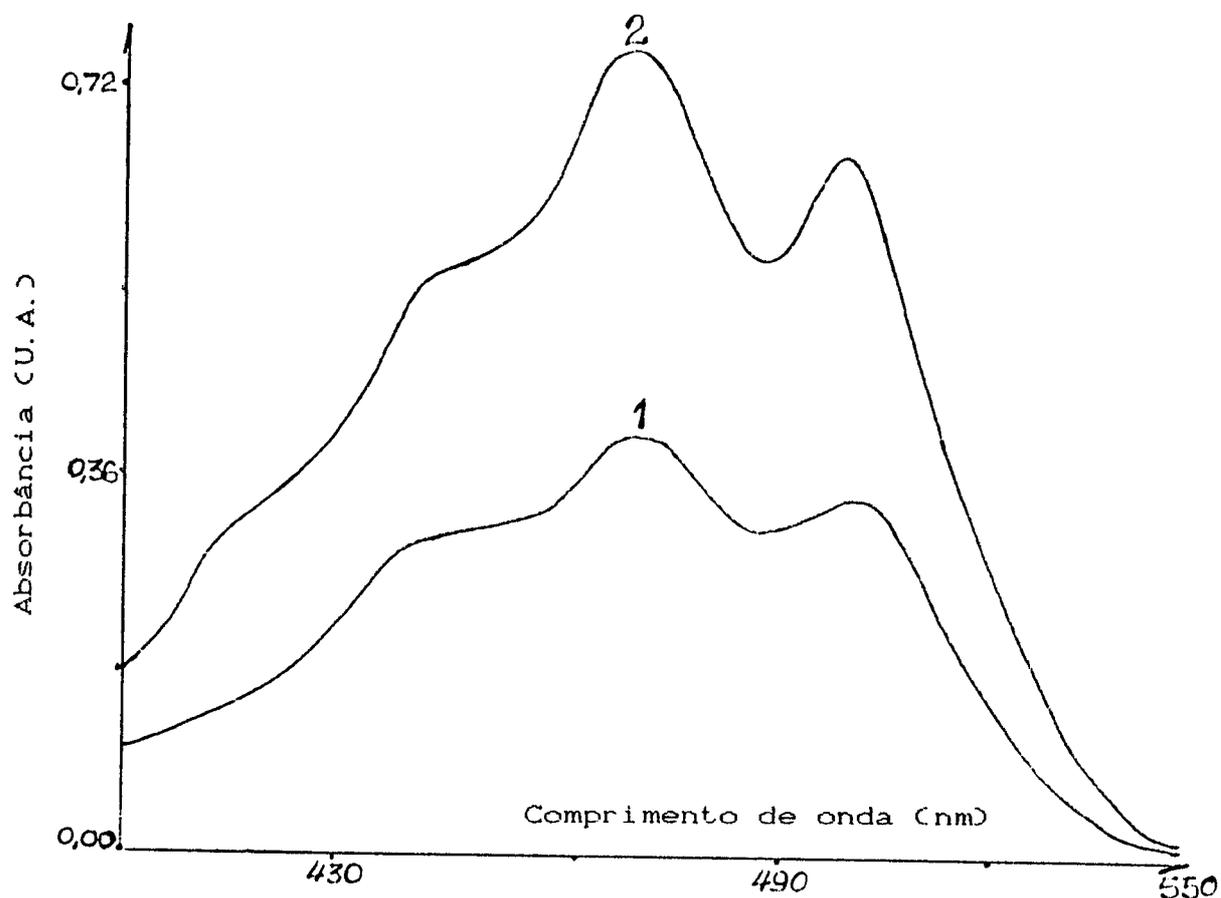


Figura 5- Espectro de absorção apresentado pelo extrato-base de urucum.

Concentração de bixina: 0,4 mg/100mL

1 = amostra E1

2 = amostra E2

Tabela 12- Purificação de bixina utilizando diferentes solventes.

Solvente	Bixina extraída (%)
Acetona	32,3
Metil-etil-cetona	28,0
Acetato de etila	23,5
Isopropanol	16,0
Éter etílico	14,2
Metanol	13,3
Éter de petróleo	0,9
Hexano	0,4
Iso-octano	0,3

Para poder iniciar o trabalho, foi importante definir com quais solventes se conseguiria trabalhar em condições de não

degradar o carotenóide bixina, isto é, trabalhando a 39°C sem necessidade de aumentar a temperatura para extrair o pigmento e eliminando, a seguir, o solvente. Depois de realizar os testes preliminares, foram descartados os seguintes solventes, que não conseguiram se ajustar às condições específicas nas quais o trabalho foi realizado: água, álcool butílico, etileno glicol, propileno glicol e tricloroetileno. O solvente não foi evaporado com êxito, em todos os casos anteriores, utilizando evaporador rotatório a vácuo. Isso porque as temperaturas de ebulição dos mesmos são muito elevadas, como já foi mostrado na Tabela 2.

O solvente que teve melhor comportamento, dentro das condições especificadas, foi a acetona (32,3%) seguido pela metil-etil-cetona (28,0%) e o acetato de etila (23,5%). Os outros solventes considerados tiveram menor eficiência ainda. Pelo observado, nenhum dos solventes utilizados conseguiu purificar o extrato inicial.

O índice de polaridade (P) pode ser definido como a medida da habilidade do solvente para interagir com vários solutos (SNYDER, 1974). Pode-se observar, assim, que o solvente com desempenho para dissolver a bixina, foi a acetona (P=5,4), em comparação com a metil-etil-cetona (P=4,5) e o acetato de etila (P=4,3). O isopropanol, embora com um valor similar a este último, por ter uma temperatura de ebulição maior (77,1°C vs. 82,3°C), teve menor eficiência. Em geral, não foram obtidos resultados positivos utilizando somente um solvente para purificar o extrato-base de urucum.

A seguir foram feitas diferentes misturas de solventes, visando obter a purificação dos extratos-base utilizados como matéria-prima. Os resultados são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13- Purificação de bixina utilizando misturas de solventes.

Mistura de solventes	Bixina extraída (%)
Acetona-hexano	20,6
Acetona-metil-etil-cetona	21,7
Acetona-tricloroetileno	55,6
Acetona-isopropanol	76,4

Das misturas testadas, a que mostrou os melhores resultados, foi a mistura acetona-isopropanol (76,4% de bixina). Ao trabalhar só com acetona obteve-se 32,3%. A mistura com isopropanol aumentou em 1,77 vezes a eficiência da purificação.

Um resultado também considerado satisfatório, foi o obtido pela mistura acetona-tricloroetileno (55,6% de bixina). A mistura com tricloroetileno aumentou em 1,48 vezes a eficiência da purificação. As outras misturas consideradas não apresentaram bom rendimento de purificação.

As misturas de solventes (item 3.3.1.3) que melhor comportamento apresentaram foram selecionadas para testar diferentes proporções entre elas. Os resultados são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14- Purificação de bixina utilizando mistura selecionadas de solventes.

Mistura de solventes	Proporção testada	Bixina extraída (%)
Acetona-isopropanol	3:1	15,4
	1:1	76,4
	1:3	*
Acetona-tricloroetileno	3:1	16,3
	1:1	55,6
	1:3	*

* O solvente não evaporou nas condições do teste.

As misturas que conseguiram purificar uma quantidade

maior de bixina nas condições do trabalho, foram acetona-isopropanol 1:1 (76,4%) e acetona-tricloroetileno 1:1 (55,6%). Quando a proporção da acetona aumentou para 3:1, foi observado que o teor de bixina caiu sensivelmente para 15,4 e 16,3% . Ao diminuir a proporção de acetona para 1:3 não foram obtidos bons resultados, isso porque o solvente não conseguiu evaporar totalmente a temperatura de trabalho utilizada.

Ao observar as temperaturas de ebulição do isopropanol e do tricloroetileno (82,3°C e 86,7°C respectivamente), em comparação com a da acetona (56,1°C), poderemos concluir que com a proporção 1:3, aumentou demais a temperatura de ebulição da mistura, o que impediu terminar a evaporação para depois medir o teor de bixina presente no extrato purificado.

4.3.2 - CRISTALIZAÇÃO

4.3.2.1 - EFEITO DOS SOLVENTES

Com os resultados obtidos nos testes preliminares para observar o comportamento de diferentes solventes e misturas de solventes com o extrato de urucum, pôde-se definir uma metodologia para tentar a purificação por cristalização, a frio, do extrato-base de urucum. As misturas de solventes utilizadas (na proporção de 1:1) e a quantidade de bixina purificada são mostradas na Tabela 15.

Tabela 15- Cristalização de bixina utilizando misturas de solventes.

Misturas de solventes	Bixina extraída (%)
Acetona-tricloroetileno	68,7
Acetona-isopropanol	66,1
Metanol-acetato de etila	55,8
Acetona-metanol	34,1
Acetona-metil-etil-cetona	29,2
Acetona-hexano	10,9

Um dos métodos mais utilizados para purificar substâncias é baixar a temperatura até um ponto em que o soluto se cristaliza e precipita purificado. Para observar o resultado desta operação, as misturas de solventes com o pigmento arrastado, por limitações operacionais, foram submetidos à temperatura de -15°C utilizando um banho refrigerado, embora a bibliografia sugerisse utilizar -20°C . Como os carotenóides se apresentam nos tecidos das plantas em concentrações relativamente baixas, não é sempre que as experiências conseguem ser realizadas em escala suficientemente ampla para conseguir o isolamento dos pigmentos na forma cristalina. DAVIES (1976) recomenda que a temperatura de -20°C seja utilizada para acelerar o processo, mas que deve ser evitada quando possível a cristalização rápida, que leva à formação de cristais de formas imperfeitas.

A mistura acetona-tricloroetileno (68,7% de bixina) foi a que apresentou melhor eficiência, junto com a mistura acetona-isopropanol (66,1%). Ao fazer a comparação entre estas duas misturas pode-se observar que, comparativamente com os testes realizados no item 4.3.1, a eficiência mostrada incrementou-se ao se aumentar a temperatura de purificação dos extratos até 39°C e diminuir a temperatura do líquido filtrado e concentrado, para provocar a precipitação da bixina. Também pode-se dizer que, a mistura acetona-tricloroetileno, com a diminuição da temperatura, separa-se em duas fases, sendo uma delas bem mais escura que a outra. Já no caso da mistura acetona-isopropanol, a formação de cristais vermelho escuro é evidente, o que indicou que houve separação da bixina. Outras misturas de solventes que apresentaram resultados de purificação interessantes foram metanol-acetato de etila (55,8%) e acetona-metanol (34,0%).

Depois de definir quais as misturas que apresentavam um melhor comportamento, dentro das condições de trabalho, elas foram testadas em diferentes proporções. Os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16- Cristalização de bixina utilizando diferentes proporções de misturas de solventes.

Misturas de solventes	Proporção utilizada	Bixina extraída(%)
Acetona-tricloroetileno	3:1	34,8
Acetona-tricloroetileno	1:1	69,9
Acetona-tricloroetileno	1:3	37,4
Metanol-acetato de etila	3:1	6,1
Metanol-acetato de etila	1:1	54,5
Metanol-acetato de etila	1:3	11,9
Acetona-isopropanol	3:1	28,4
Acetona-isopropanol	1:1	67,3
Acetona-isopropanol	1:3	20,3
Metanol-acetona	3:1	12,1
Metanol-acetona	1:1	33,7
Metanol-acetona	1:3	41,6

Confirmando os testes realizados, a melhor eficiência foi apresentada pela mistura acetona-tricloroetileno 1:1 (69,9% de bixina) seguida por acetona-isopropanol 1:1 (67,3% de bixina).

4.3.2.2. RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO POR CRISTALIZAÇÃO

Foi feita uma comparação entre o teor de bixina purificada, o de bixina presente no resíduo das purificações e o rendimento apresentado para cada purificação (item 3.3.2.3). Os resultados são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17- Rendimento da purificação por cristalização.

Mistura solvente	Proporção utilizada	% bixina purificada	% bixina resíduo	rendimento purificação(%)
Acetona-tricloroetileno	1:1	69,9	3,1	21,2
Acetona-isopropanol	1:1	67,3	8,3	16,4
Metanol-acetato de etila	1:1	54,5	15,8	11,7
Acetona-metanol	1:3	41,6	16,1	13,0

A mistura de solventes que apresentou os melhores resultados foi a de acetona-tricloroetileno (1:1). O residuo dessa purificação foi o que continha menor teor de bixina (3,1%) e o rendimento foi o mais elevado (21,2%) dentre todos os testados. Uma mistura de menor eficiência, foi acetona-isopropanol (1:1) com um residuo da purificação com 8,3% de bixina e o rendimento total da purificação de 16,4%.

4.3.3 - PRECIPITAÇÃO

4.3.3.1 - A PARTIR DO EXTRATO-BASE DE URUCUM

4.3.3.1.1 - EFEITO DO SOLVENTE

Para escolher o solvente adequado precisava-se testar o comportamento das diferentes misturas escolhidas em presença de água, para tornar a mistura mais polar, considerando a porcentagem de bixina purificada e o rendimento bruto da purificação. Os resultados são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18- Purificação de bixina com misturas de solventes.

Misturas	Amostra	Bixina no extr. purif.(%)	Rendimento da purific.(%)
Etanol-água (1:1)	E2	82,6	7,1
Acetona-isopropanol + água (1:1+2)	E1	56,6	13,4
Acetona-isopropanol + água (1:1+2)	E2	81,2	19,0

Tanto a mistura etanol-tricloroetileno-água, como a acetona-tricloroetileno-água apresentaram separação dos solventes em duas fases com a redução do pH e não precipitou o sólido corante. Etanol-acetato de etila-água apresentou-se muito instável e, em consequência, não se conseguiu estabilizar o pH da solução. Já nas misturas etanol-água (na amostra E1) e acetona- acetato de

etila-água (nas amostras E1 e E2), a purificação foi ruim se considerarmos o rendimento inexpressivo. Estas misturas foram descartadas porque não se conseguiu purificar a bixina.

As misturas que melhor se comportaram na purificação da bixina foram etanol-água e acetona-isopropanol-água. Elas apresentaram uma polaridade mais eficiente na extração da bixina. O álcool etílico foi selecionado pela facilidade de sua obtenção e baixo custo no Brasil, comparado com outros solventes. A mistura acetona-isopropanol foi escolhida após testes com diferentes solventes, por causa do potencial de extração do corante das sementes de urucum. Os três solventes estão incluídos na lista das substâncias químicas que podem ser utilizadas em alimentos (CODEX, 1984). Finalmente, foi decidido trabalhar com a mistura acetona-isopropanol-água (concordando com SPIRO, 1990), porque o rendimento da extração sempre foi mais elevado que o mostrado pela mistura etanol-água, seja trabalhando com a amostra 1 ou com a amostra 2 de extrato-base de urucum.

Para poder definir qual a melhor proporção de acetona-isopropanol e extrato-base de urucum, foram testadas diferentes relações, mas só conseguiu-se boa precipitação ao considerar 100:1. Ao observar que as amostras nas quais se usou uma proporção menor não precipitavam, concluiu-se que a quantidade de solvente era insuficiente. Nas primeiras experiências foi efetuada uma concentração prévia da amostra, em evaporador rotatório a vácuo, para diminuir o volume final do solvente após a mistura, mas a concentração da amostra demonstrou não ter influência na precipitação e essa técnica foi abandonada.

A variação principal nas três purificações desenvolvidas foi a temperatura de extração utilizando-se 30, 35, 40, 50 e 65°C para as experiências, comparando-a com a temperatura ambiente. Os resultados podem ser observados na Tabela 19 e os espectros de absorção obtidos são mostrados na Figura 6.

Tabela 19- Variações na temperatura de purificação utilizada em relação com a quantidade de bixina e o rendimento final (média de resultados obtidos em triplicata).

Temperatura purificação (°C)	Bixina purificada (%)	Rendimento* bruto da purificação (%)	Rendimento** real da purificação (%)	Incremento*** na pureza
ambiente	66,3	2,9	4,4	1,0
30	82,2	6,5	9,9	1,3
35	94,7	17,5	26,6	1,5
40	91,1	16,0	24,5	1,4
50	86,1	12,7	19,4	1,3
65	82,6	6,8	6,8	1,3

Bixina no extrato-base de urucum = 65,5%

* Rendimento bruto = (peso extr.purificado/peso real bixina) x 100

** Rendimento real = (peso extr.purificado/peso real bixina) x 100

Peso real bixina = peso extr-base x % bixina extr-base

*** Incremento na pureza = % bixina extr.purificado/% bixina extr-base

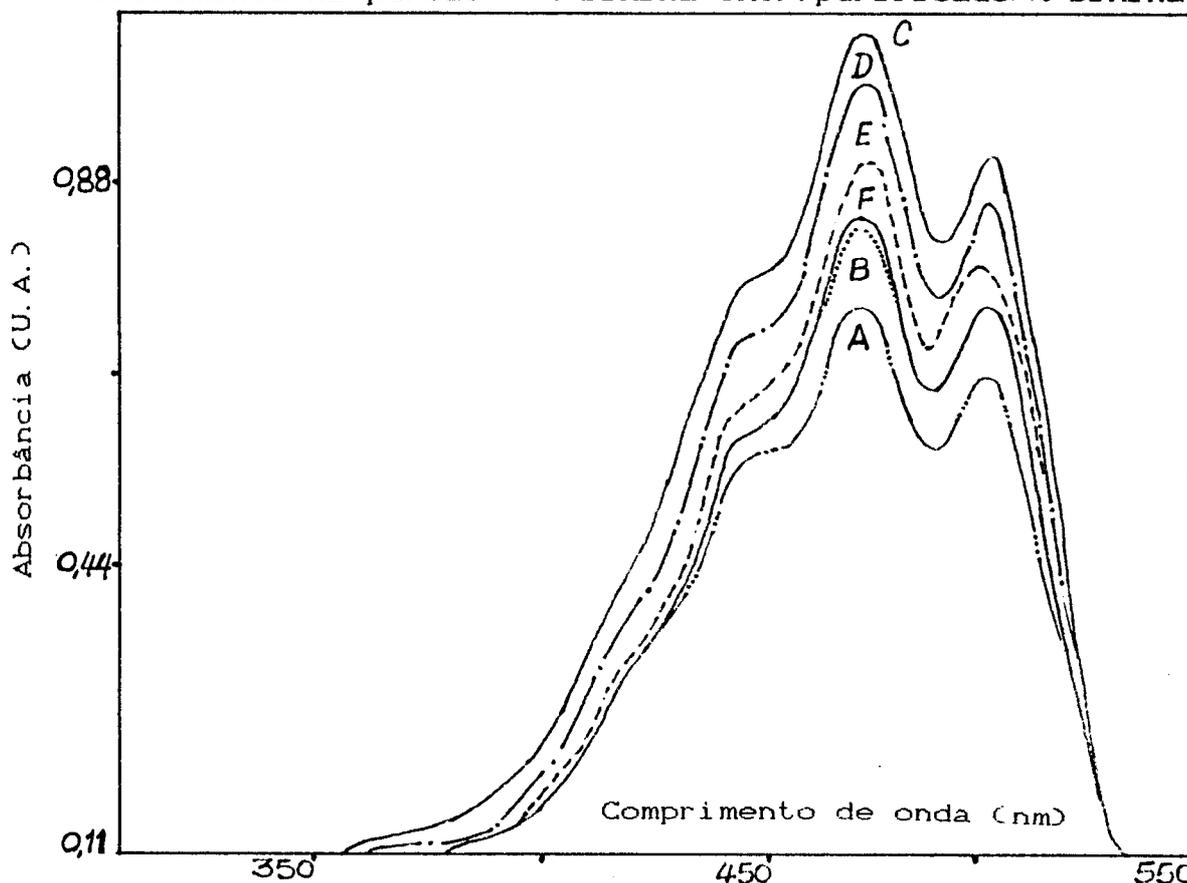


Figura 6- Espectros de absorção apresentados pelos extratos purificados de bixina a diferentes temperaturas de purificação (°C): A(ambiente), B(30), C(35), D(40), E(50) e F(65)

Pode-se observar na Tabela 19, que a melhor temperatura para fazer a purificação, nas condições de trabalho, foi 35°C porque obteve-se uma quantidade elevada de bixina purificada (94,7%) com um rendimento bruto de purificação de 17,5%, um pouco maior que o rendimento obtido na purificação feita a 40°C, de 16,0% e 91,1% de bixina no final.

Analisando as diferentes concentrações de bixina, obtidas na purificação da bixina dos extratos-base de urucum, em função da temperatura de purificação, pode-se observar que, quando a temperatura de purificação foi aumentando de 35 para 40, 50 e 65 °C, os dados seguem um padrão linear, de acordo com a equação de regressão:

$$C = 107,9097 - 0,0,4090T$$

$$\text{coeficiente de regressão } (r^2) = 0,9575$$

onde C = concentração de bixina (%) e T = temperatura (°C)

Foi observado que, quando a temperatura de purificação decresce de 40 para 35°C acontece um aumento na concentração da bixina. Os dados foram submetidos à análise de variância e as temperaturas de 40 e 35°C diferiram significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, sendo de 2,8395 % a diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Tukey, o que indicou que a melhor temperatura de purificação é a de 35°C.

Temperaturas abaixo de 35°C foram consideradas insuficientes para conseguir uma purificação adequada, porque não se consegue extrair o pigmento junto com a mistura solvente. Isto pode-se comprovar melhor ao observar o teor de bixina presente na purificação à temperatura ambiente (66,3%) e rendimento bruto de 2,9%.

Temperaturas de purificação acima de 40°C tendem a formar um pigmento amarelo de degradação indesejável no produto

final (McKEOWN, 1963; McKEOWN, 1965). A 50°C a purificação obtida foi de 86,1% e o rendimento de 12,7% e a 65°C chegou-se a 82,6% e o rendimento bruto de apenas 6,8%. Baseado nestes resultados, a temperatura adequada para fazer as purificações não deve ultrapassar 40°C, pelo risco de degradação térmica do extrato-base como afirma a bibliografia consultada (DAVIES, 1976; CHAO et alii, 1991).

Foram feitas mais duas purificações sucessivas a partir do resíduo do extrato-base de urucum descartado da primeira purificação, para observar se justificava a recuperação da bixina. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 20 e calculados conforme o item 3.3.3.1.4.

Tabela 20- Purificações sucessivas do extrato-base de urucum.

Temperatura de purificação(°C)	Número da purificação	Bixina no extr. purific.(%)	Rendimento purificação(%)
35	1a.	94,7	17,5
35	2a.	76,4	4,3
35	3a.	53,8	0,9

Para fazer este teste foi utilizada a temperatura de 35°C em três purificações sucessivas. Pode-se observar que de um rendimento total de purificação de 22,7% (somando os rendimentos brutos das três purificações), 17,5% correspondeu à primeira purificação com 94,7% de bixina, enquanto que a terceira e última purificação teve um rendimento bruto de 0,9% e 53,8% de bixina. Embora o custo para fazer purificações sucessivas seja mais elevado, fica como opção para poder aumentar o rendimento total da purificação.

4.3.3.1.2 - MUDANÇA DO pH

Para definir o momento em que deveria ser realizada a mistura do solvente pigmentado com a água fria (conforme o item 3.3.3.1.5), no Método A a mistura foi feita antes da redução do pH

e no Método B, a ordem foi invertida, colocando a água depois da redução do pH, obtendo-se um comportamento similar ao primeiro método, ou seja, conseguindo-se em ambas experiências a precipitação da bixina em pH 3,5.

Nos métodos A e B, o pH inicial foi de 4,5 e 5,5 respectivamente. Para poder atingir o pH de precipitação, precisou-se reduzir o pH até 3,5 com HCl 1,0 N.

As variações na solubilidade de compostos químicos pela mudança do pH são importantes, especialmente na purificação de substâncias, pois ocorrem mudanças do estado de equilíbrio, quando então o sólido pode ser separado da solução (VOGEL, 1951; PIMENTEL & SPRATLEY, 1974).

Para realizar a referida precipitação, foi utilizado um funil de separação, que facilitou a diferenciação das fases líquida superior e sólida inferior com o corante separado por gravidade. Posteriormente, ao considerar que o calor poderia afetar negativamente a obtenção da bixina e gerar um pigmento amarelo de degradação (McKEOWN, 1963), preferiu-se realizar a secagem à temperatura ambiente.

4.3.3.1.3 - RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO

Ao se comparar os rendimentos obtidos, observando a Tabela 19, pode-se afirmar que temperaturas inferiores a 35°C foram consideradas insuficientes e superiores a 40°C, excessivas. Daí, admitiu-se que a temperatura de 35°C é a mais adequada para realizar a purificação dos extratos de urucum, pois o rendimento final é muito superior àqueles obtidos nas duas experiências anteriores, ou seja, 94,7% de bixina e rendimento real de 26,6%, a partir do extrato de urucum. Entretanto a temperatura de 40°C foi considerada dentro dos limites de trabalho ao apresentar 91,1% de bixina e rendimento real de 24,5% no produto final.

A Tabela 19 mostra também o incremento obtido na pureza a diferentes temperaturas de purificação. O extrato purificado a 35°C apresentou o maior incremento na pureza (1,5 vezes), seguido da temperatura de purificação de 40°C e incremento na pureza de 1,4 vezes.

Os diferentes resultados obtidos no item 4.3.3.1, confirmam a temperatura de 35°C foi a mais adequada para purificar o extrato de urucum nas condições do presente trabalho.

4.3.3.2 - A PARTIR DE SEMENTES DE URUCUM

Foram desenvolvidos dois tipos de extração de bixina das sementes de urucum: alcalino e ácido. O método alcalino foi uma modificação da Patente 60,184,566 do JAPÃO (1984), de Tadamasa & Yasuda, enquanto o método ácido associou os processos de obtenção do extrato de urucum e de purificação por precipitação.

4.3.3.2.1 - TIPO DE SOLVENTE

Os solventes utilizados no método alcalino foram água e álcool etílico (1:4), adicionando-se solução de hidróxido de sódio a 0,3%. Originalmente, a Patente 60,184,566 do JAPÃO (1984) recomendava utilizar NaOH 0,6%, mas testes de laboratório demonstraram que o pH inicial a ser atingido para posteriormente conseguir precipitar a bixina, deve ser inferior a 11.

Já no caso do método ácido, foram utilizados os solventes acetona e isopropanol em proporções iguais. Segundo o CODEX (1984), estes solventes podem ser utilizados no processamento de alimentos.

4.3.3.2.2 - TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO

Em ambos os casos, a extração foi executada por duas

horas à temperatura ambiente com agitação, para evitar que temperaturas maiores de 40°C formassem um pigmento amarelo de degradação que diminuiria o poder tintorial da bixina (McKEOWN, 1963). Por outro lado, à temperatura ambiente a extração do corante pode demorar mais para ocorrer a extração que em temperatura elevada (MURTHI et alii, 1989).

4.3.3.2.3 - EFEITO DO pH NA PURIFICAÇÃO DA BIXINA

A Tabela 21 demonstra o comportamento do pH em relação ao teor de bixina nos diferentes extratos purificados no método alcalino (item 3.3.3.2.1).

Tabela 21- Comportamento do pH vs. quantidade de bixina presente nos extratos purificados no método alcalino (média de resultados obtida por triplicata).

Amostra	pH inicial	pH final	% bixina extr. purif.
A	9,89	7,0	69,5
B	10,74	7,0	73,4
C	11,22	7,0	51,2
D	12,55	7,0	50,8
E	13,49	7,0	40,9

O melhor pH para a purificação foi de 10,74 (73,4% de bixina), a medida que os valores de pH foram aumentando, houve uma queda drástica na porcentagem de bixina dos extratos.

Para reduzir o pH, foi usado ácido sulfúrico a 10% (v/v). Foram feitos vários testes preliminares tendo como ponto de partida o pH numa faixa entre 9 e 13 e diferentes concentrações de bixina no extrato final, após precipitação do pigmento em pH 7. Acredita-se que as soluções pigmentadas alcalinas obtidas com pH acima de 11, transformam a bixina em norbixato, que com a posterior neutralização do pH origina norbixina (INGRAM & FRANCIS, 1969; CARVALHO & HEIN, 1989). O urucum é hidrossolúvel só em pH

superior a 8, pois abaixo deste ocorre precipitação de norbixina (CAUSLANDER et alii, 1977). Tem sido mencionado na literatura que essa forma de pigmento é útil para se usar como corante alimentício como uma forma esterificada de bixina, desde que seja neutra e não ácida (DENDY, 1966a).

Pode-se então sugerir, que nas amostras A e B (69,5 e 73,4% de bixina), com valores de pH menores que 11, sem sofrer aquecimento, não houve formação de norbixina, mas somente bixina. Então, a partir de valores superiores a esse pH (amostras C, D e E), ocorreria a saponificação do grupo éster, formando norbixina dentro de uma reação considerada irreversível. Isto coincide com as pesquisas de ENGELHARDT et alii (1988).

No método ácido, para provocar a mudança do pH empregou-se o método testado no item 4.3.3.1.2. Foi medido o pH inicial (4,5 ou 5,5 dependendo do método) e abaixou-se até 3,5 com solução de HCl 1 N, pH necessário para precipitar o pigmento. As operações posteriores até a obtenção do extrato purificado foram desenvolvidas conforme o item 4.3.3.1. O teor obtido em bixina, de acordo com o pH, é mostrado na Tabela 22.

Tabela 22- Efeito do pH no teor de bixina obtido nos extratos purificados no método ácido (média dos resultados obtida por triplicata).

Método	pH inicial	pH final	% bixina extr. pur. (\bar{x})
A	4,5	3,5	68,7
B	5,5	3,5	69,3

Pode-se observar que o teor de bixina obtido nos extratos finais, dependendo do método utilizado para conseguir a precipitação do corante, não apresentou diferença significativa (67,8 e 69,3% de bixina para os métodos A e B, respectivamente).

4.3.3.2.4 - RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO

A Tabela 23 relaciona o teor de bixina presente no extrato purificado (item 4.3.3.2) com o rendimento obtido nos métodos alcalino e ácido a partir de sementes. Pode-se observar que a porcentagem de bixina obtido no método alcalino (73,4%) foi maior do que no método ácido (69,3%). De acordo com o rendimento real obtido (77,5 vs. 52,8%), pode-se afirmar que o método alcalino é mais efetivo do o ácido.

Tabela 23- Relação entre quantidade de bixina, rendimento obtido e incremento na pureza dos métodos alcalino e ácido.

Método	Bixina no extr. purif.(%)	Rendimento bruto(%) *	Rendimento real(%) **	Incremento na pureza ***
Alcalino	73,4	1,8	77,6	31,2
Ácido	69,3	1,2	52,8	29,5

* Rendimento bruto = (peso extr.purificado/peso sementes) x 100

** Rendimento real = (peso extr.purificado/peso real bixina) x 100
peso real bixina = (peso sementes) x (% bixina sementes)

*** Incremento na pureza = % bixina extr.purificado/% bixina sementes

Nos dois métodos, foi utilizada a mesma amostra comercial de sementes de urucum contendo 2,4% de bixina. O extrato cuja pureza aumentou mais após processamento foi o obtido no método alcalino (31,2 vezes), o do método ácido aumentou 29,5 vezes. Embora a diferença entre ambos extratos não seja significativa, os rendimentos apresentados na Tabela 37, confirmam que o método alcalino foi mais adequado para se obter bixina com elevado grau de pureza, a partir de sementes comerciais.

4.4 - CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS PURIFICADOS DE BIXINA.

Para caracterizar os extratos purificados obtidos por diferentes processos, eles foram agrupados segundo a metodologia utilizada: ácida ou alcalina.

4.4.1 - EXTRATOS OBTIDOS POR MÉTODO ÁCIDO

Para fazer comparações entre os resultados dos diferentes extratos purificados de bixina, obtidos por método ácido (item 3.3.3), utilizou-se cromatografia em camada delgada (CCD) para identificar e verificar a presença da bixina e para verificar e confirmar a pureza da bixina presente nos mesmos.

Foram comparados os cromatogramas de três amostras: extrato purificado a 35°C (E35), utilizado como amostra padrão, extrato purificado a 40°C (E40) e extrato purificado obtido a partir de sementes (ES). Os resultados são mostrados na Figura 7.

Os diferentes extratos apresentaram duas faixas de cor amarela, com características similares, conforme TIRIMANNA (1981), embora a faixa amarela mais escura, correspondente ao Rf1, mostrou um Rf cada vez maior, com valores de 0,75 correspondentes ao extrato purificado obtido a 35°C (E35), até 0,82 para o extrato purificado, obtido diretamente a partir de sementes (ES). Para DENDY (1966a), o valor deste Rf deve ser aproximadamente 0,7 em amostras de bixina pura, quando utilizada como fase móvel clorofórmio-acetona-ácido acético (50:50:1), concordando com o afirmado por RAMAMURTHY & BHALERAO (1964) e FRANCIS (1965). Em geral, estes resultados não apresentaram uma diferença real entre as amostras.

Os espectros de absorção dos diferentes extratos são mostrados na Figura 8 e se ajustam à curva teórica da bixina, com

dois picos em 470 e 503 nm, conforme a bibliografia (McKEOWN, 1962).

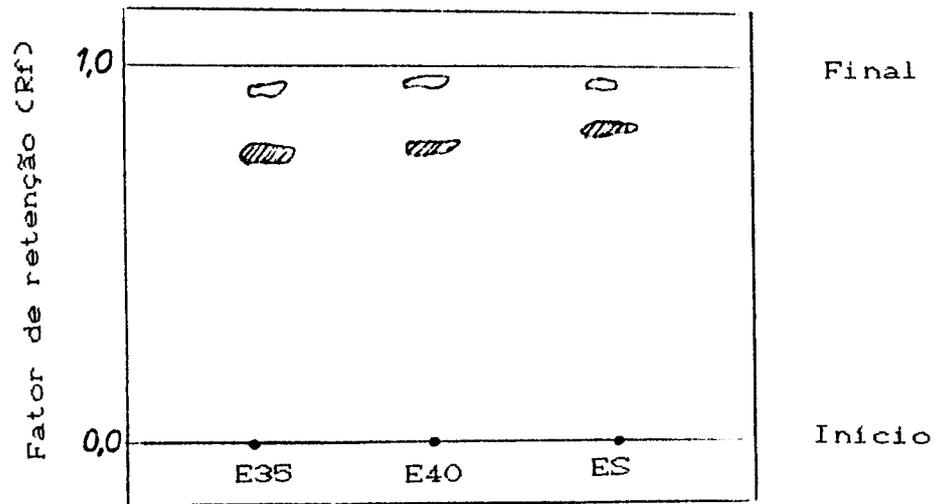


Figura 7- Cromatograma em camada delgada (CCD) dos extratos purificados obtidos por método ácido.

E35 = extrato obtido a 35°C
E40 = extrato obtido a 40°C
ES = extrato obtido direto de sementes

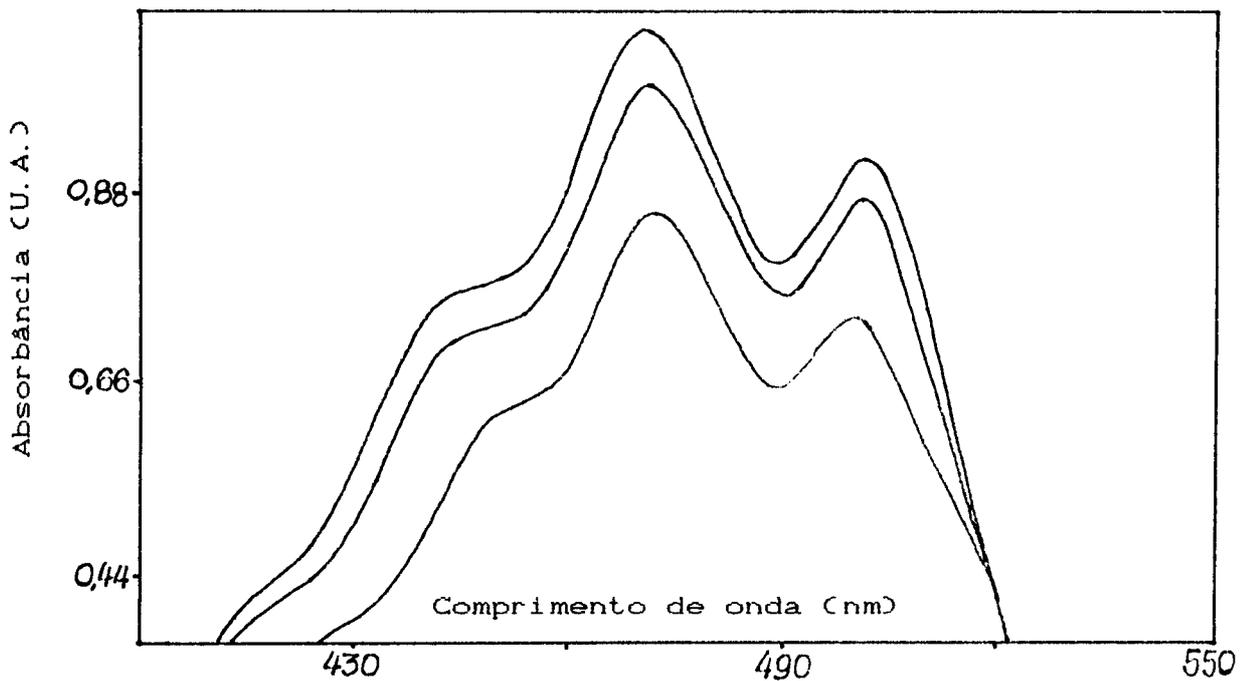


Figura 8- Espectros de absorção apresentados pelos extratos purificados obtidos por metodologia ácida.

E35 = extrato obtido a 35°C
E40 = extrato obtido a 40°C
ES = extrato obtido direto de sementes

Para confirmar a presença e quantificar a bixina, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), comparando-a com uma amostra padrão. Os cromatogramas podem ser observados na Figura 9 e confirmam claramente a presença de bixina com o tempo de retenção de 8,26 minutos. Utilizando o detector de arranjo de diodos, foi possível obter além dos cromatogramas, os espectros de absorção nos picos máximos.

Para tentar determinar se a bixina estava na configuração *cis* ou *trans*, aplicou-se gotas de solução de iodo em clorofórmio à amostra e fez-se a leitura espectrofotometricamente cinco minutos depois, foi possível observar que houve um deslocamento hipsocrômico, indicando que a bixina originariamente estava na configuração *cis*. Já WOOD et alii (1991) explicam que na extração e purificação do corante, vários produtos de rearranjo ou de isomerização podem ser formados. Calor moderado pode fazer com que a *cis*-bixina (ou α -bixina) seja convertida em seu isômero *trans* (ou β -bixina).

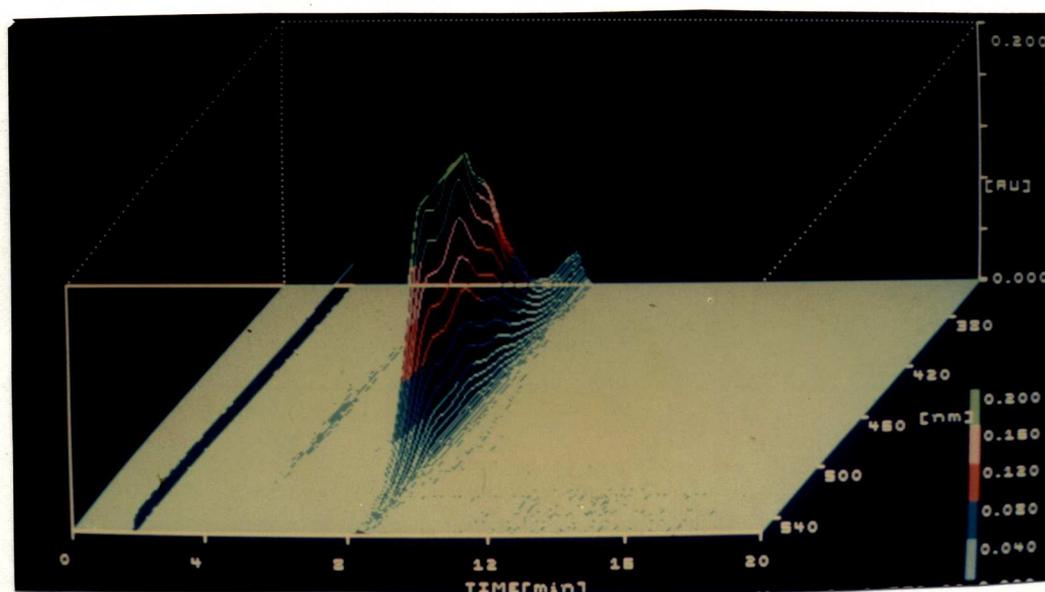


Figura 9- Cromatograma (CLAE) tridimensional apresentado pelo extrato purificado obtido por método ácido, mostrando a presença do isômero *cis*-bixina (Tr 8,26 minutos).

4.4.2 - EXTRATOS OBTIDOS POR MÉTODO ALCALINO

Os cromatogramas dos extratos purificados de urucum em camada delgada e o sistema solvente indicado, foram utilizados para verificar a presença e pureza da bixina. A Figura 10 mostra que os extratos A e B apresentaram características similares. Já os extratos C, D e E apresentaram uma quantidade maior de faixas. A faixa amarela mais escura mostrou um Rf cada vez maior, de 0,78 no extrato A até 0,87 no extrato E. Também pode ser observado o comportamento dos extratos obtidos por método alcalino comparados com os valores apresentados pelo extrato purificado a 35°C (item 4.3.3.1.1), utilizado padrão como referência.

A Figura 11 mostra os espectros de absorção apresentados pelos extratos purificados de bixina obtidos por método alcalino, nos quais cada espectro ajustou-se exatamente à curva teórica para bixina.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência, feitas nos extratos purificados, confirmaram a presença de bixina, que foi identificada e quantificada por comparação com um padrão de bixina. Os cromatogramas podem ser observados na Figura 12.

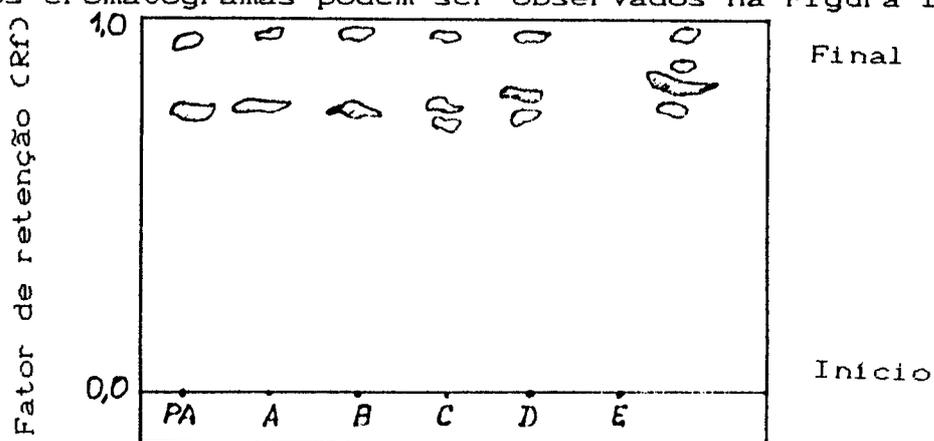


Figura 10- Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos purificados de bixina, obtidos por método alcalino.

Extratos obtidos a pH inicial diferente = A (9,89), B (10,74), C (11,22), D (12,55) e E (13,49).
PA = extrato obtido a 35°C

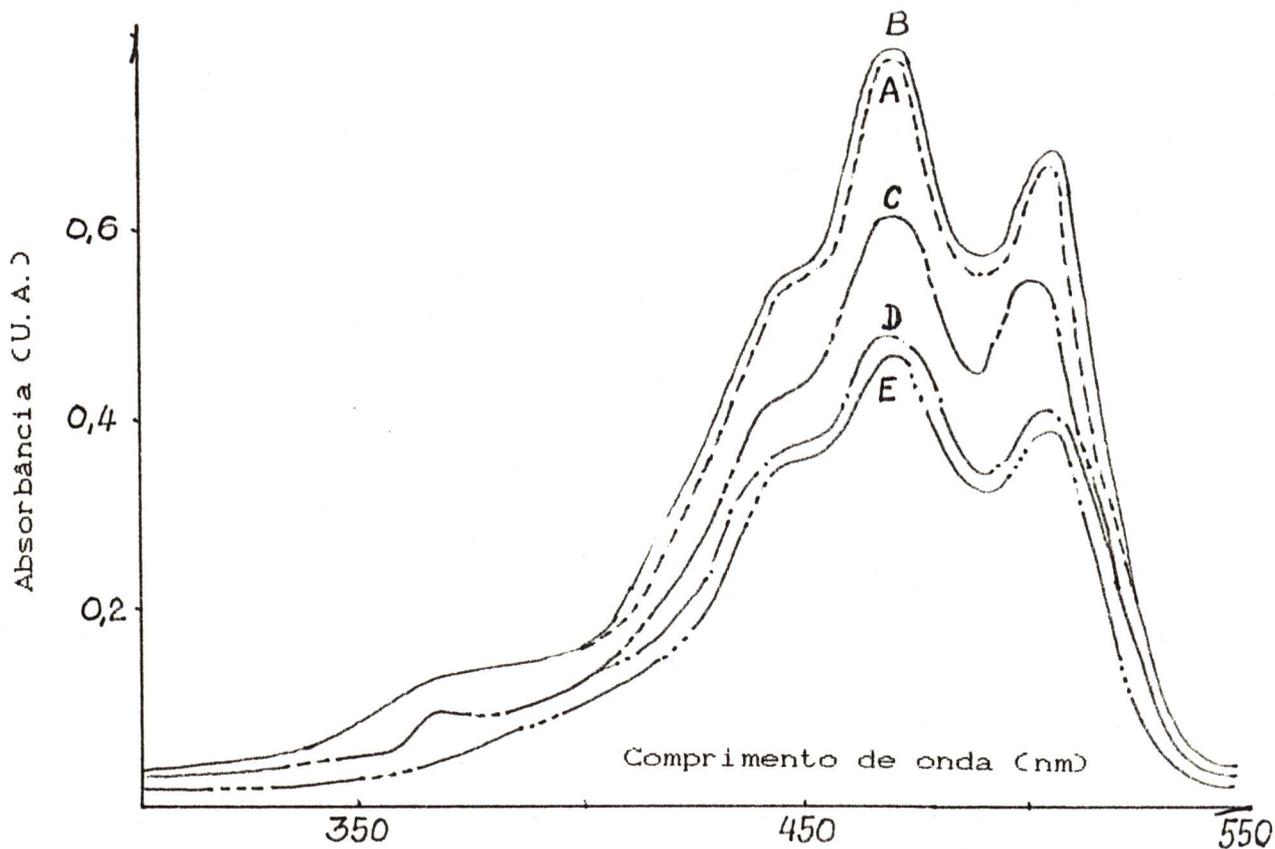


Figura 11- Espectros de absorção dos extratos purificados de bixina, obtidos por método alcalino.

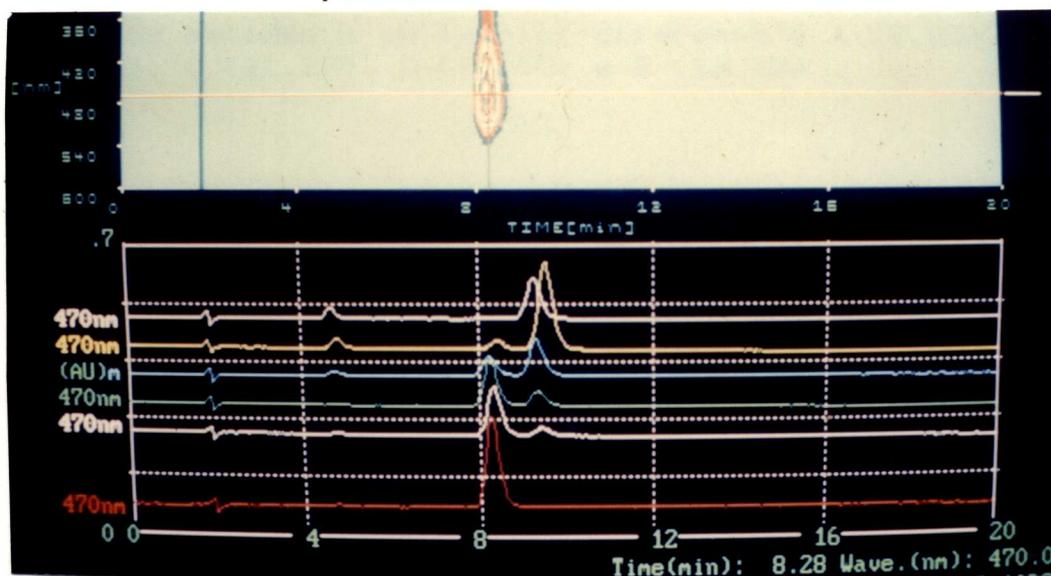


Figura 12- Cromatogramas (CLAED) dos extratos purificados de bixina obtidos por extração alcalina.

pH de extração: A(9,89), B(10,74), C(11,22), D (12,55) e E(13,49)

A Figura 13 mostrou que, enquanto há diminuição da concentração do componente com o tempo de retenção de 8,26 minutos para valores de pH mais altos, há progressivo aumento na concentração do componente com o tempo de retenção (Tr) de 9,34 minutos. Segundo WOOD et al. (1991), esses componentes poderiam ser identificados como *cis*-bixina e *trans*-bixina respectivamente.

Ao mesmo tempo, apareceu um outro componente com o Tr de 4,67 minutos a partir do pH 11,22 e que foi aumentando com a elevação do pH, que poderia ser identificado como norbixina (ver Figura 14). Segundo INGRAM & FRANCIS (1969), extrações realizadas em pH acima de 11, transformam a bixina em um sal de norbixina, que por acidificação produz a norbixina. Para BAUERNFEIND et alii (1971), a bixina é o principal pigmento das preparações lipossolúveis do urucum e a norbixina, o produto de saponificação da bixina, a principal matéria corante das preparações hidrossolúveis de urucum. Isto é explicado por MOSS & WEEDON (1976), que afirmam que a conversão de um ácido carotenóico, em seu carboxilato correspondente, ocorre pela adição de álcali em uma solução alcoólica, normalmente acompanhada por uma mudança na absorção máxima de luz visível e que esta mudança pode ser reversível pela adição de ácido mineral, em excesso. Antes deles, MAYER (1943) afirmava que a bixina contém um grupo carboxila e outro metoxila, que tratado com hidróxido de sódio diluído, vai tornar primeiro um sal monossódico e depois, mais lentamente, um sal dissódico. Este último, depois de sofrer a adição de ácido não formará mais bixina e sim norbixina, que não contém nenhum grupo metoxila.

Em geral, diferentes pesquisadores (McKEOWN & MARK, 1962; DENDY, 1966B; PRESTON & RICKARD, 1980; WOOD et alii, 1991; GODOY, 1993), afirmaram que a isomerização é uma das propriedades amplamente conhecidas dos carotenóides e que os isômeros são considerados artefatos, formados durante o processamento e as etapas críticas.

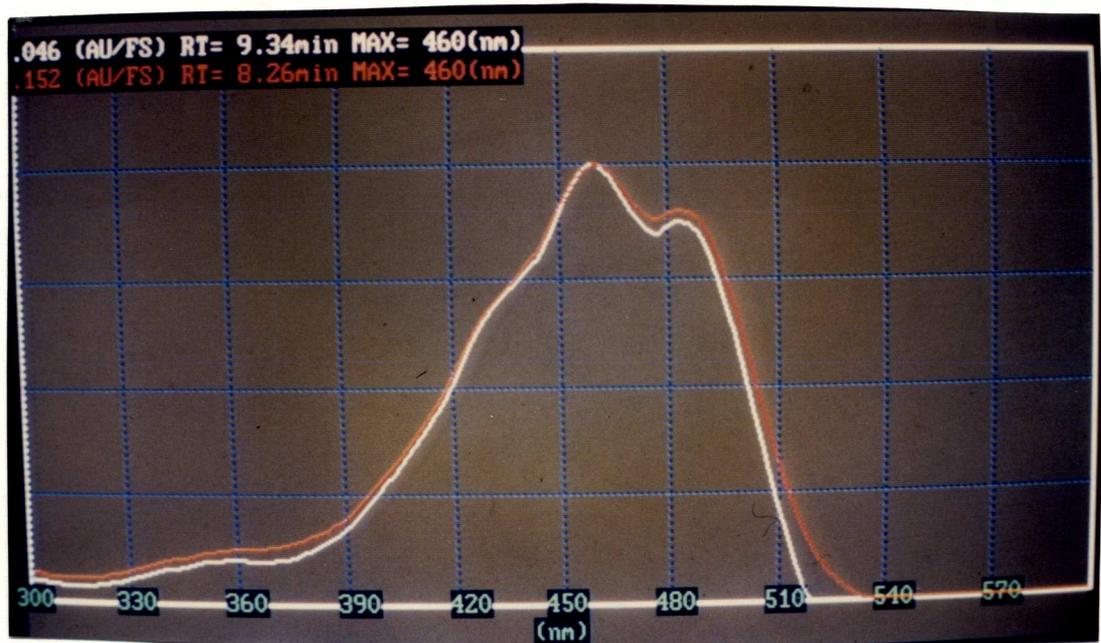


Figura 13- Espectros de absorção obtidos pelo detector por arranjo de diodos do extrato purificado B (pH 10,74) mostrando a presença dos isômeros *cis*-bixina e *trans*-bixina. (Tr de 8,26 e 9,34 minutos, respectivamente)

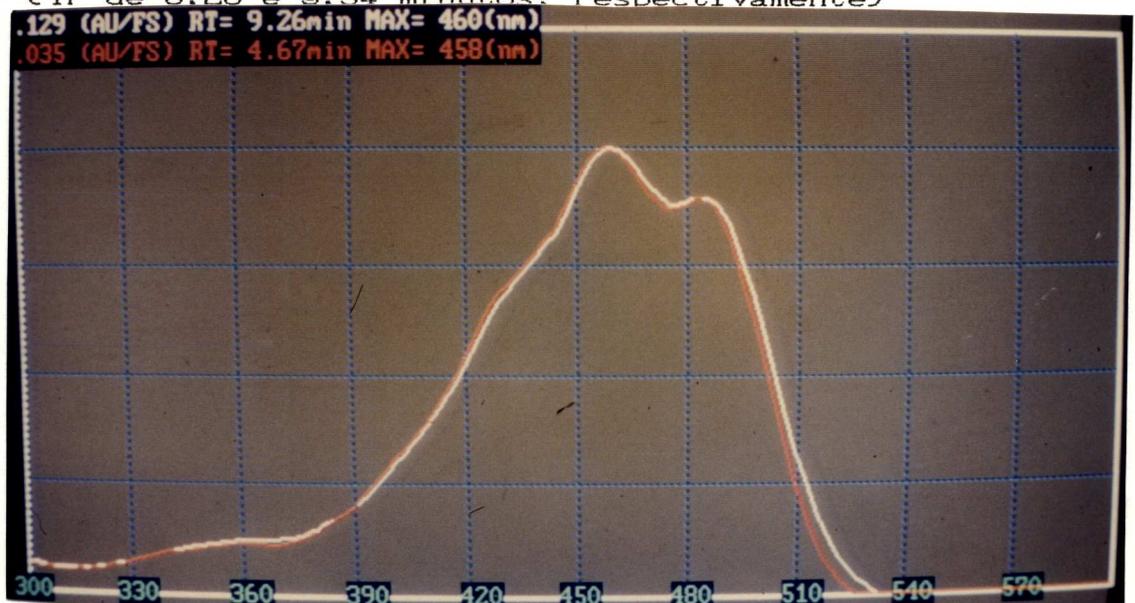


Figura 14- Espectros de absorção obtidos pelo detector por arranjo de diodos do extrato purificado E (pH 13,49) mostrando a presença de norbixina e *trans*-bixina. (Tr de 4,67 e 9,26 minutos, respectivamente)

4.5 - OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROMISCÍVEL DE BIXINA.

Foi preparado um extrato hidromiscível de bixina a partir do extrato purificado obtido por precipitação (item 3.3.3.1), utilizando secagem por "spray-dryer", baseado em pesquisas desenvolvidas por BEATUS et alii (1985) e ZILBERBOIM et alii (1986).

4.5.1 - SOLUBILIDADE DOS EXTRATOS NA EMULSÃO.

Para definir qual a proporção mais adequada entre o extrato purificado utilizado (E35) e o emulsificante solúvel em água, foi medida a solubilidade do extrato na emulsão formada, determinando-se o teor de bixina presente na emulsão e a quantidade de bixina que ainda presente no líquido sobrenadante após centrifugação.

Para fazer o teste, considerando que se desejava obter um produto final com características aquosas, foram utilizados 2 emulsificantes "solúveis em água", isto é, do tipo emulsão óleo/água, com HLB acima de 14 e que não apresentam riscos à saúde: Tween 80 e Cremophor RH40, como mostra a Tabela 24.

Tabela 24- Comportamento das emulsões obtidas utilizando Tween 80 e Cremophor RH-40.

Emulsificante utilizado	Quantidade de emulsificante(%)	Bixina na emulsão(%)	Bixina no centrifugado(%)
Tween 80	1	20,9	---
	3	24,3	---
	5	28,0	0,1
	8	30,5	3,1
	10	29,9	8,2
Cremophor RH-40	1	34,1	3,5
	3	34,2	3,5
	5	30,2	3,1
	8	30,1	5,1
	10	30,2	5,0

Os resultados indicam que os dois emulsificantes "solúveis em água" apresentam comportamentos diferentes pois, enquanto o Cremophor RH-40 foi dissolvido nas condições do teste, o Tween 80 apresentou dificuldade, demorando muito mais tempo. Acredita-se que se a temperatura tivesse sido aumentada, esses problemas não ocorreriam. Segundo a literatura, a quantidade máxima razoável de emulsificante que pode-se adicionar à mistura, sem risco de comprometer o sabor, deveria ser de 8 %. Baseado nesses dados, pode-se dizer que quantidades menores a 8% de Cremophor RH-40 podem ser utilizadas satisfatoriamente, em comparação com o emulsificante Tween 80 em condições similares.

4.5.2 - SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO.

A mistura dos componentes foi feita em duas etapas: primeiro, foi preparada uma emulsão por homogeneização do extrato purificado com 8% de Cremophor RH-40, com melhor comportamento nos testes preliminares. Depois, esta emulsão foi misturada com água e maltodextrina, com ajuda de um emulsificador de alta rotatividade.

Esta mistura foi secada por atomização, utilizando um "spray-dryer" nas condições indicadas anteriormente. O material seco, de cor laranja, foi colocado em frasco de vidro e armazenado para ser utilizado posteriormente. Segundo BEATUS et alii (1985), este é um método para proteger o corante ativo constituinte, baseado na secagem por atomização de uma emulsão estável, no qual o corante é dispersado em uma solução aquosa de um polímero natural apropriado. Já ZILBERBOIM et alii (1986) afirmam que a microencapsulação, produzida ao se trabalhar com temperaturas não muito elevadas, é muito utilizada na indústria de alimentos pois converte materiais líquidos na forma sólida ou em pó, mais prático para seu uso, estendendo sua vida-de-prateleira.

4.6 - UTILIZAÇÃO DOS EXTRATOS EM UMA FORMULAÇÃO ALIMENTÍCIA.

Foi preparado um refresco com sabor de tangerina utilizando uma formulação comercial, com extrato purificado de bixina a 35°C (E35 do item 4.3.3.1.1) e extrato hidromiscível de bixina obtido por atomização (item 4.5).

Depois de desenvolver uma formulação adequada para cada caso, o pH final foi de 2,91 e 3,16 para os extratos purificado e hidromiscível, respectivamente. Os dois extratos apresentaram um tom laranja, mas o refresco preparado com o extrato purificado E35 teve uma aparência límpida e transparente, enquanto o refresco preparado com o extrato hidromiscível apresentou-se turvo. Estas duas amostras foram utilizadas para testar o efeito da luz na estabilidade da bixina.

4.7 - ESTABILIDADE DA BIXINA.

4.7.1 - EFEITO DA LUZ.

Foi utilizada uma formulação para preparo de refresco comercial de tangerina, apresentada no item 3.6, onde os dois tipos de refresco foram colocados em sistema luz/ar, porque segundo MOSS & WEEDON (1976), a bixina é um dos poucos carotenóides que são surpreendentemente estáveis ao ar. Isto concorda com o afirmado por NAJAR et alii (1988), que a perda de bixina é fortemente afetada pelo aumento de luminosidade da lâmpada e que, embora a luz apresente um forte efeito destrutivo na cor da bixina, efeitos combinados de luz e oxigênio são similares ao efeito da luz sem oxigênio. A presença simples de oxigênio não afeta a perda de bixina mas sim a presença de luz.

Os resultados do teste de estabilidade à luz do refresco comercial com sabor de tangerina preparado com extrato hidromiscível de bixina seco por atomização (item 3.5), são

mostrados na Tabela 25. Os espectros de absorção podem ser observados na Figura 15.

Tabela 25- Estabilidade à luz apresentada pelo refresco preparado com extrato hidromiscível de bixina.

Dia N°	% bixina no escuro	Bixina remanescente no escuro (%)	% bixina na luz	Bixina remanescente na luz (%)
0	0,2434	100,00	0,2434	100,00
1	0,2402	98,68	0,1525	62,65
2	0,2405	98,80	0,1087	44,66
4	0,2391	98,23	0,0901	37,02
7	0,2390	98,19	0,0754	30,98
10	0,2377	97,66	0,0735	30,19
15	0,2352	96,63	0,0612	25,14
21	0,2348	96,47	0,0513	21,08
30	0,2339	96,09	0,0435	17,87

Considerando como 100,00% o teor de bixina remanescente no refresco no tempo zero, após um dia de exposição à luz a perda de bixina é de quase a terceira parte da bixina do início (62,65% de bixina remanescente), mas depois de 30 dias o teor de bixina remanescente foi de 17,87% do total. Já no caso do refresco colocado na escuridão, após 30 dias a quantidade de bixina remanescente foi de 96,09%. Isto concorda com a literatura (DAVIES, 1976), que afirma que a exposição à luz direta do sol ou luz ultravioleta, induz à fotoisomerização *cis-trans* e leva à fotodestruição dos carotenóides.

Para o refresco preparado com extrato hidromiscível, os dados de perda de bixina, em função do tempo, estão de acordo com uma equação de regressão linear de primeira ordem, que descreve seu comportamento.

$$\text{Luz} \quad -\ln C = 1,9874 + 0,0459t$$

$$r^2 = 0,7460$$

Escuro

$$-\ln C = 1,4261 + 0,0010t$$

$$r^2 = 0,9038$$

onde C = concentração de bixina (%) e t = tempo (dias)

A análise das equações mostra que a bixina dentro do refresco com extrato hidromiscível na luz apresentou uma taxa de degradação de 0,0459% por dia de tratamento. Já a bixina dentro do refresco com extrato hidromiscível na escuridão apresentou uma taxa de degradação de 0,0010% de bixina por dia de tratamento. Sendo a diferença mínima significativa (d.m.s.) de 0,0215, a ação da luz sobre a degradação da bixina foi significativamente maior que a ação da escuridão no refresco preparado utilizando extrato hidromiscível de bixina.

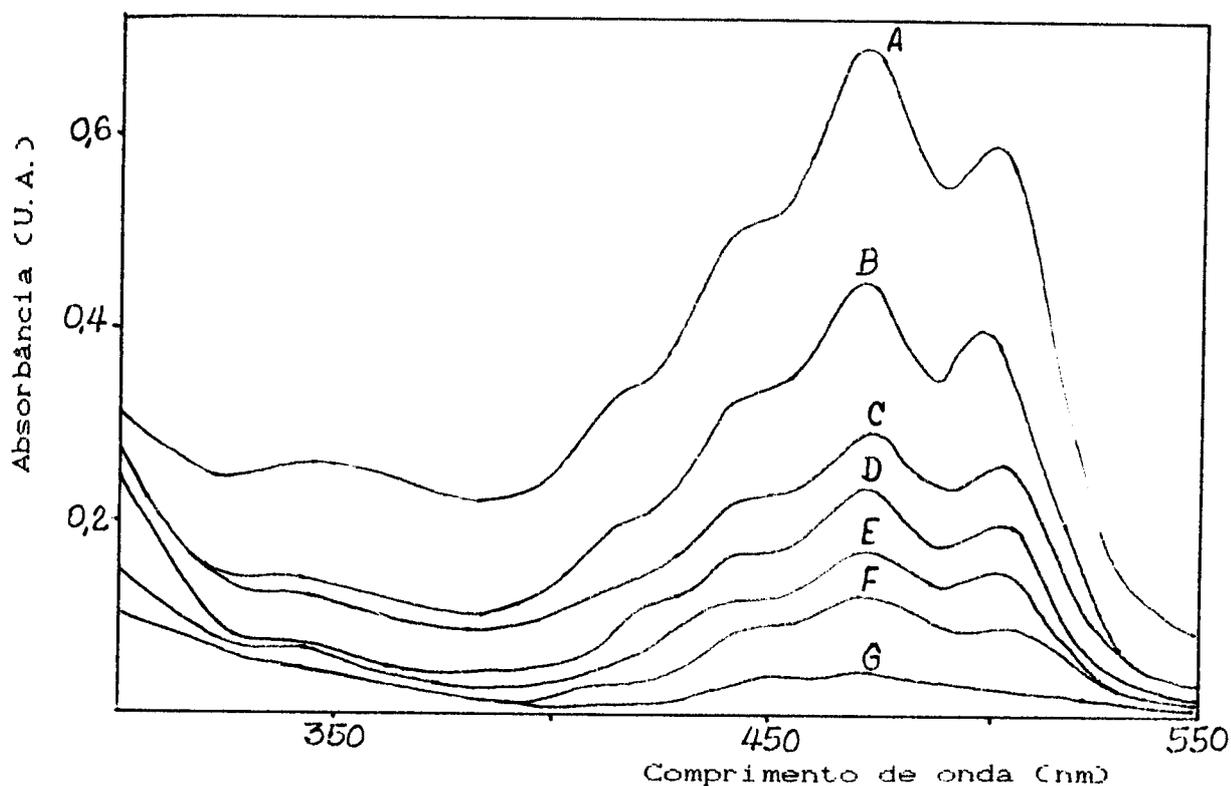


Figura 15- Espectros de absorção apresentados pelo refresco preparado utilizando extrato hidromiscível de bixina no teste de estabilidade à luz.

Em número de dias: A (0), B (1), C (2), D (4), E (7), F (10) e G (15).

Os resultados do teste de estabilidade à luz, para o refresco comercial com sabor tangerina preparado utilizando o extrato purificado de bixina e obtido a partir de extrato-base de urucum (item 3.3.3.1), são mostrados na Tabela 26. Os espectros de absorção obtidos podem ser observados na Figura 16.

Tabela 26- Estabilidade à luz apresentada pelo refresco preparado utilizando extrato purificado de bixina.

Dia N°	% bixina no escuro	Bixina remanescente no escuro (%)	% bixina na luz	Bixina remanescente na luz (%)
0	0,2601	100,00	0,2601	100,00
1	0,2592	99,65	0,1313	50,48
2	0,2583	99,31	0,0221	8,49
4	0,2574	98,96	0,0194	7,46
7	0,2566	98,65	0,0183	7,04
10	0,2535	97,46	0,0122	4,69
15	0,2498	96,04	0,0087	3,34
21	0,2491	95,77	0,0067	2,58
30	0,2487	95,62	0,0044	1,69

Considerando como 100% o teor de bixina remanescente no refresco no tempo zero, após um dia de exposição à luz a perda de bixina é de quase a metade da bixina do início (50,48% de bixina remanescente no refresco), mas depois de 30 dias a quantidade de bixina remanescente foi de 1,9% do total. Já no caso do refresco colocado no escuro, após 30 dias a quantidade de bixina remanescente foi de 95,62%.

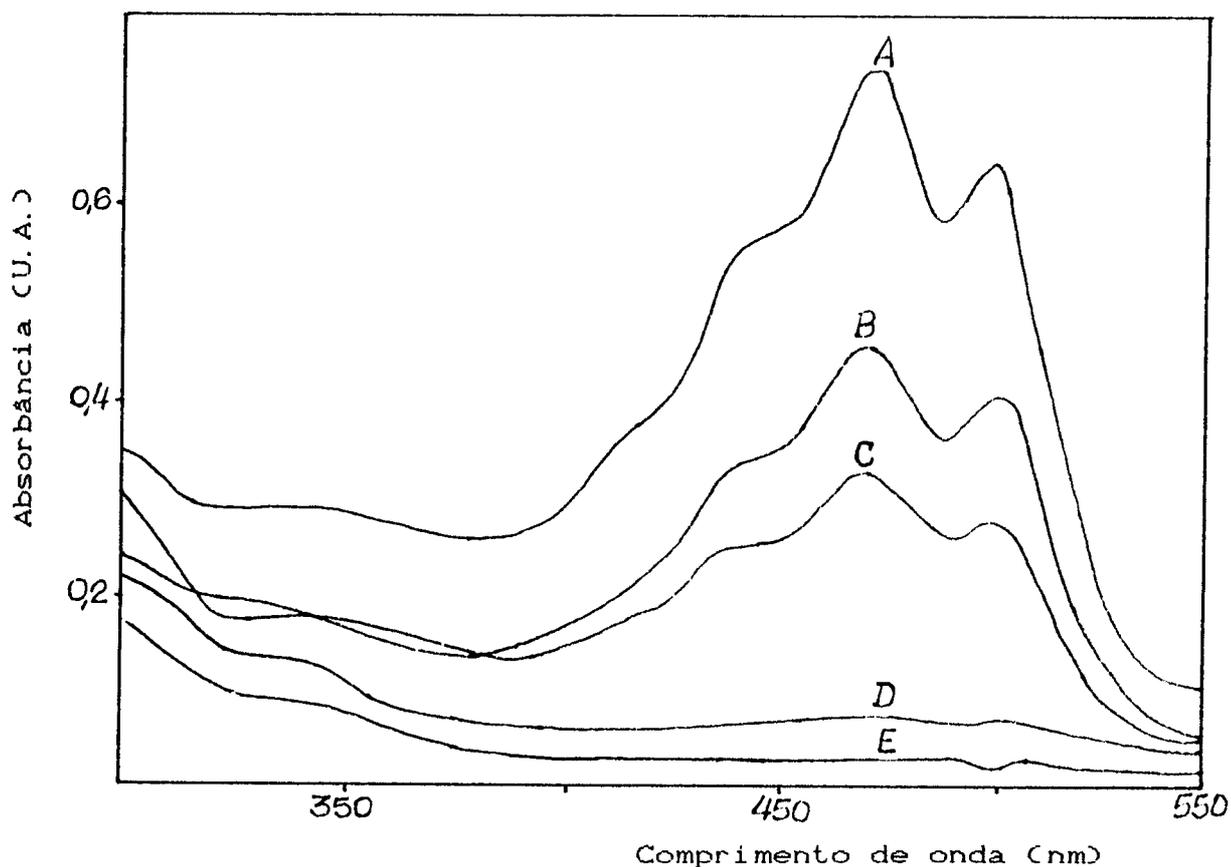


Figura 16- Espectros de absorção apresentados pelo refresco preparado utilizando extrato purificado de bixina no teste de estabilidade à luz.

Em número de dias: A (0), B (1), C (2), D (4) e E (7).

Para o refresco preparado com extrato purificado, os dados de perda de bixina, ao longo do tempo, estão de acordo com uma equação de regressão linear de primeira ordem, que descreve seu comportamento.

Luz
$$-\ln C = 2,7825 + 0,1072t$$

$$r^2 = 0,6559$$

Escuro
$$-\ln C = 1,3539 + 0,0015t$$

$$r^2 = 0,9026$$

onde C = concentração de bixina (%) e t = tempo (dias)

Ao analisar as equações lineares pode-se observar que a

bixina no refresco preparado a partir do extrato purificado, na luz apresentou uma taxa de degradação de 0,1072% de bixina por dia de tratamento. Já a bixina dentro do refresco com extrato purificado na escuridão apresentou uma taxa de degradação de 0,0015% de bixina por dia de tratamento. Sendo a diferença mínima significativa (d.m.s.) de 0,0233, a ação da luz sobre a degradação da bixina foi significativamente maior que a ação da escuridão no refresco preparado utilizando extrato purificado de bixina, concordando com TEIXEIRA NETO et alii (1981).

Pode-se observar que na luz, a queda de bixina é muito mais acentuada no refresco preparado com extrato purificado (taxa de degradação = 0,1072%/dia), considerando que a bixina da formulação utilizada para preparar o extrato hidromiscível (taxa de degradação = 0,0459%/dia) torna-se mais estável, talvez pela presença de maltodextrina, polímero de baixo peso molecular, que produz uma microencapsulação das partículas de bixina, capturando-as e protegendo-as (LABUZA, 1980). Em geral, o refresco feito a partir de extrato hidromiscível manteve coloração alaranjada opaca leve após 30 dias, enquanto o refresco preparado com extrato purificado perdeu quase que totalmente a coloração amarela brilhante inicial, tornando-se incolor.

Comparando o comportamento dos dois refrescos mantidos no escuro, eles não apresentaram diferenças significativas entre si, mostrando taxas de degradação de 0,0010% e 0,0015% por dia, no extrato hidromiscível e no purificado de bixina, respectivamente. Em geral, o oxigênio presente no ar não foi significativamente ativo na degradação da bixina, como foi comunicado por MOSS & WEEDON (1976) e NAJAR et alii (1988).

A Figura 17 mostra a diferença entre a coloração apresentada pelos dois tipos de refresco onde pode-se observar a queda na concentração de bixina em ambos os casos.



Figura 17- Diferença de coloração, produto da degradação da bixina, apresentada pelos dois tipos de refresco: utilizando extrato hidromiscível (tubos de ensaio à esquerda) e extrato purificado de bixina (tubos de ensaio à direita).

As constantes de velocidade das reações de degradação à luz (de primeira ordem) e o tempo de meia vida, obtidos a partir das equações 1 e 2 do item 3.7.5, são fornecidos na Tabela 27.

Tabela 27- Constantes de velocidade de reação (K) e meia-vida ($t_{1/2}$) para degradação da bixina em relação à luz (900 lux)

Condições experimentais	$K \times 10^{-3}$ (dia^{-1})	$t_{1/2}$ (dias)
EH, escuro	1,00	693
EH, luz	45,90	15
EP, escuro	1,50	462
EP, luz	107,20	6

EH = extrato hidromiscível de bixina
EP = extrato purificado de bixina

Comparando-se os valores de meia-vida para o refresco preparado com extrato hidromiscível, observou-se uma sobrevida 46 vezes maior no escuro que em condições de luz. Já, para o refresco preparado com extrato purificado, a sobrevida foi aproximadamente 77 vezes.

Considerando que, para as provas de estabilidade à luz, trabalhou-se com refrescos utilizando extrato hidromiscível e extrato purificado de bixina, a sobrevida foi 2,5 vezes maior para o primeiro deles. Já no escuro, o refresco a partir de extrato hidromiscível teve uma sobrevida 1,5 vezes maior que o refresco a partir de extrato purificado.

Em geral, a análise dos dados apresentados mostrou que a luz tem um considerável efeito desestabilizador sobre a bixina.

4.7.2 - EFEITO DA TEMPERATURA.

Foram utilizados dois tipos de extrato, um obtido por método alcalino e o outro por método ácido, submetidos à temperatura de 105°C, onde se encontram a maioria das temperaturas de processamento de alimentos.

4.7.2.1 - EXTRATOS OBTIDOS POR MÉTODO ALCALINO

Os resultados obtidos por espectrofotometria (Figuras 18, 20, 22, 24 e 26) e cromatografia líquida de alta eficiência (Figuras 19, 21, 23, 25 e 27) mostraram o comportamento dos extratos purificados pelo método alcalino (do item 3.3.3.2.1) e aquecidos a 105°C por 0, 2, 4, 8 e 12 horas. A quantificação feita para comparar os rendimentos obtidos está apresentada na Tabela 28.

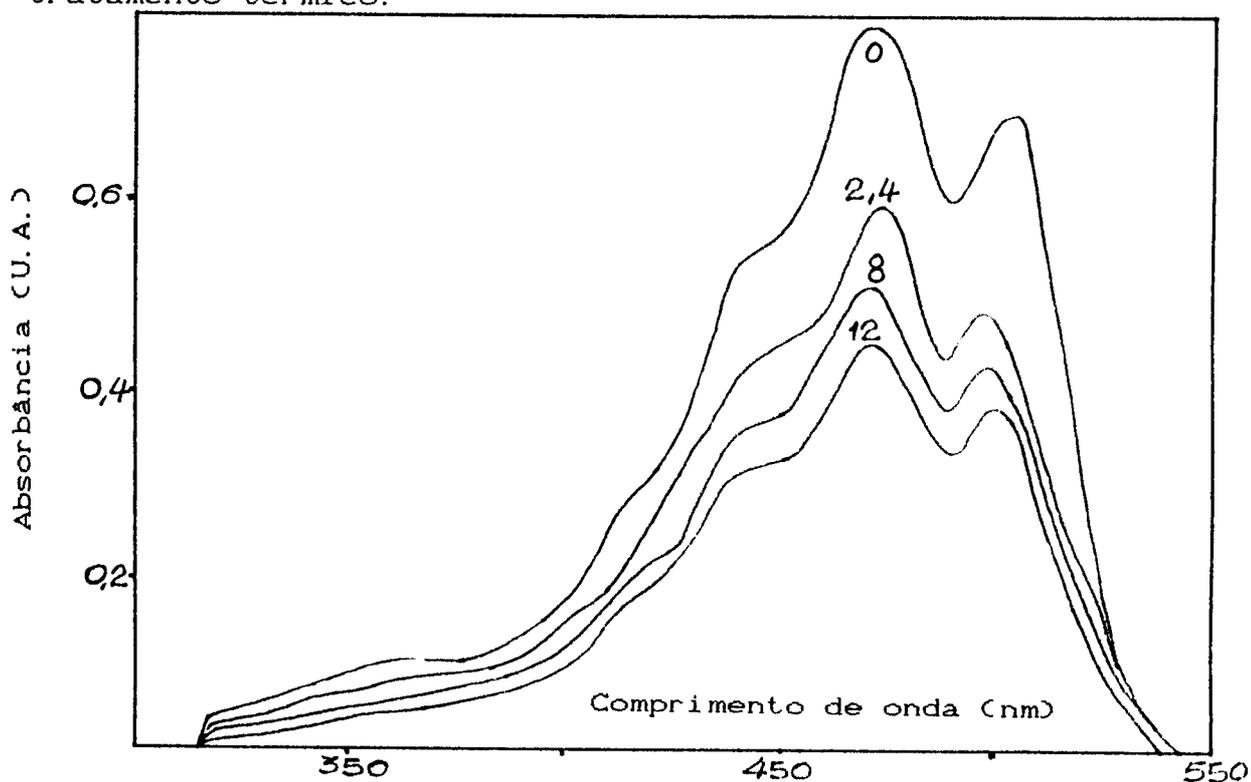
Tabela 28- Estabilidade à temperatura dos extratos obtidos pelo método alcalino, aquecidos a 105°C por 0, 2, 4, 8 e 12 horas.

* Extrato	tempo	cis-bixina(%)	trans-bixina(%)	bixina total(%)
A	0	59,6	10,0	69,6
	2	39,5	8,6	48,1
	4	40,7	8,0	48,7
	8	38,5	6,1	44,6
	12	33,0	6,0	38,9
B	0	62,0	11,3	73,4
	2	40,0	6,9	46,9
	4	34,0	12,2	46,2
	8	36,0	13,1	49,1
	12	28,7	9,3	38,0
C	0	16,5	35,4	51,9
	2	10,2	24,5	34,7
	4	8,1	19,5	27,6
	8	6,0	14,0	20,0
	12	3,4	6,8	10,1
D	0	5,9	44,9	50,8
	2	4,3	39,5	43,8
	4	2,8	33,7	36,5
	8	3,3	31,9	35,2
	12	0,9	18,9	19,8
E	0	----	40,9	40,9
	2	----	31,6	31,6
	4	----	23,6	23,6
	8	----	19,7	19,7
	12	----	14,6	14,6

* % de NaOH na extração = A(0,2), B(0,3), C(0,4), D(0,5) e E(0,6)

Pode-se observar que os extratos A e B mostraram um comportamento diferente que os extratos C, D e E. O extrato A (pH de purificação 9,89) no tempo zero apresentou 69,5% de bixina remanescente, enquanto que com 12 horas a 105°C, esta quantidade reduziu a 38,9%. O mesmo foi observado para o extrato B (pH de purificação 10,74), para os tempos zero e 12 horas, que teve o teor de bixina remanescente reduzido de 73,4% para 38,01%. É importante ressaltar que os teores de cis-bixina foram maiores que para trans-bixina, para os extratos A e B.

No extrato C, enquanto que para o tempo zero apresenta 51,9%, em 12 horas é de 10,1%. A porcentagem de *cis*-bixina mostrou-se menor que a de *trans*-bixina e a queda geral mostra também maior degradação térmica. O comportamento do extrato D (pH de purificação 12,55) foi similar. Já no extrato E (pH de purificação 13,49) foi observado que o isômero *cis* não aparece mais no cromatograma, com a presença apenas do isômero *trans*, reduzindo de 40,9% para o tempo zero, até 14,6% para 12 horas de tratamento térmico.



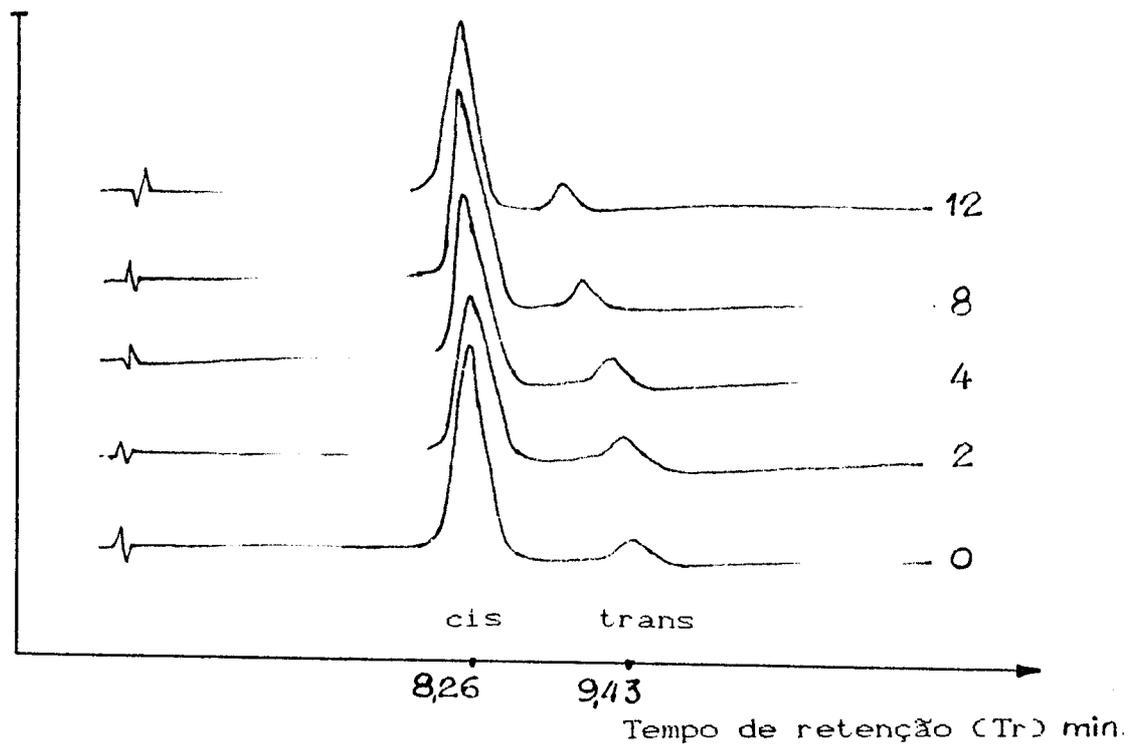


Figura 19- Cromatogramas (CLAED) do extrato obtido em pH 9,89 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

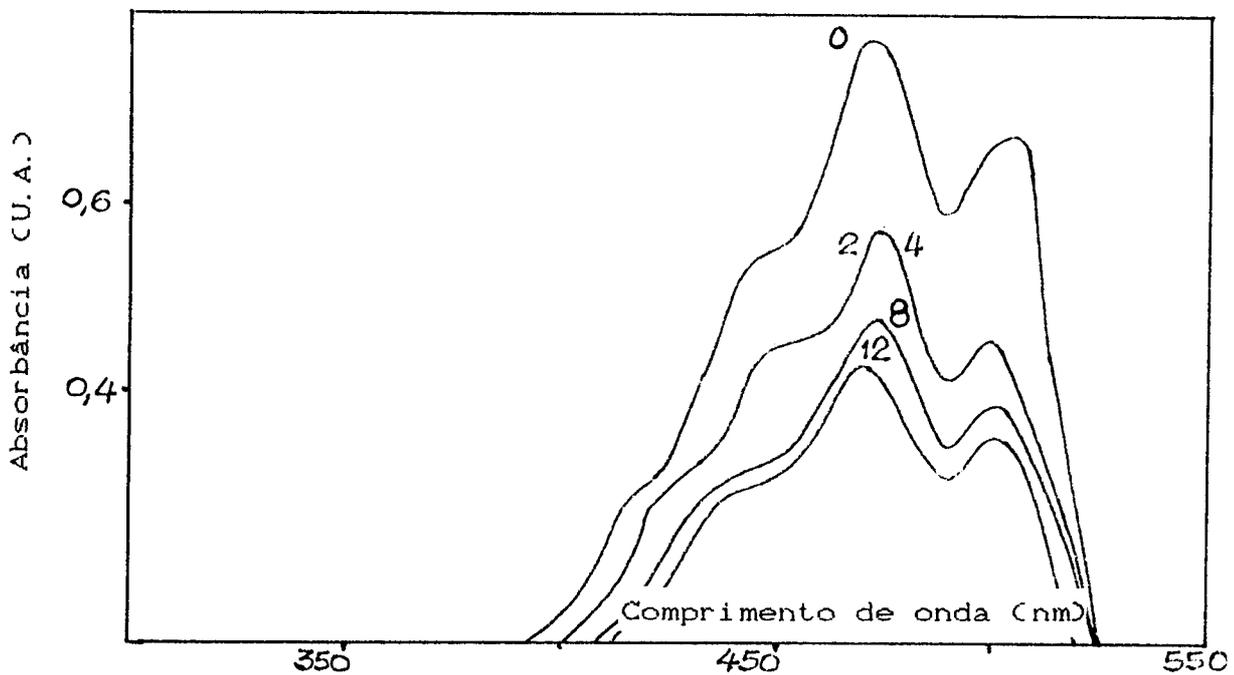


Figura 20- Espectros de absorção do extrato obtido em pH 10,74 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

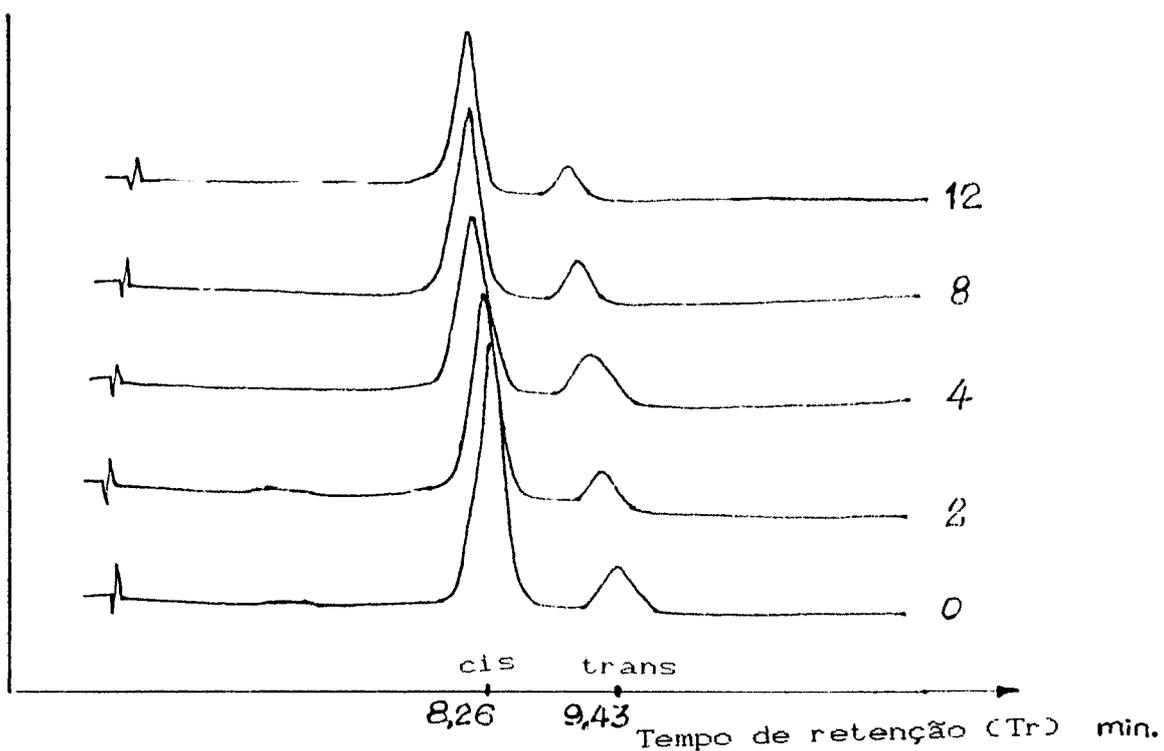


Figura 21- Cromatogramas (CLAEE) do extrato obtido em pH 10,74 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

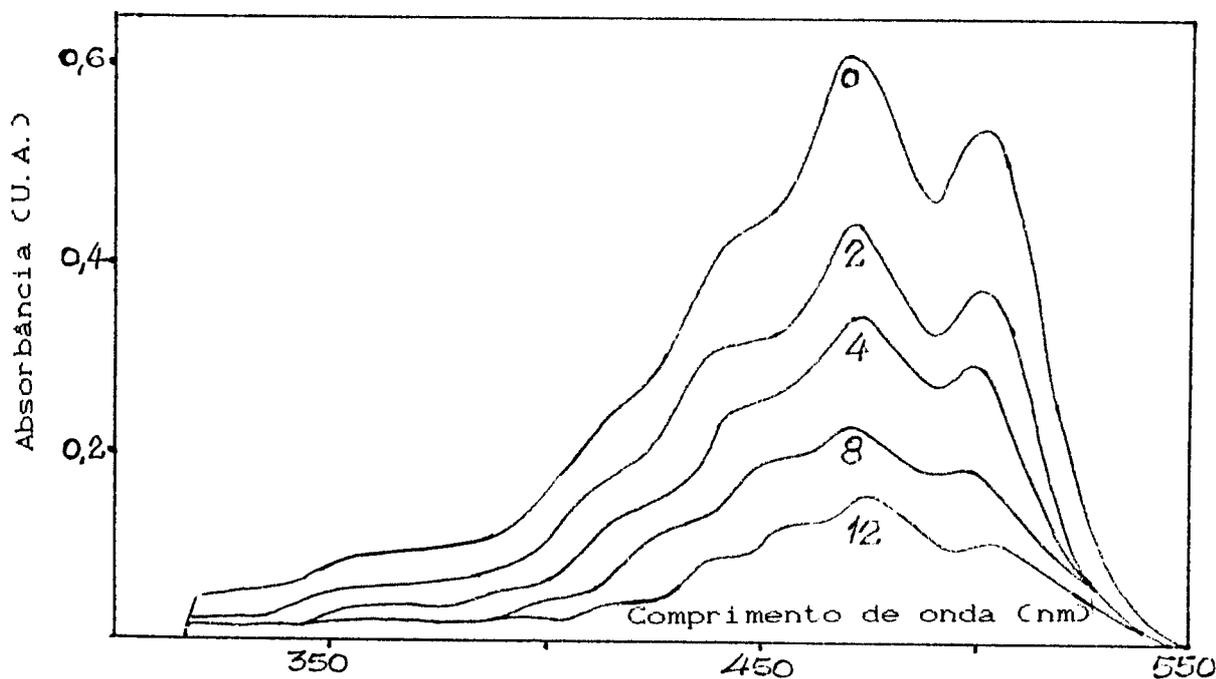


Figura 22- Espectros de absorção do extrato obtido em pH 11,22 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

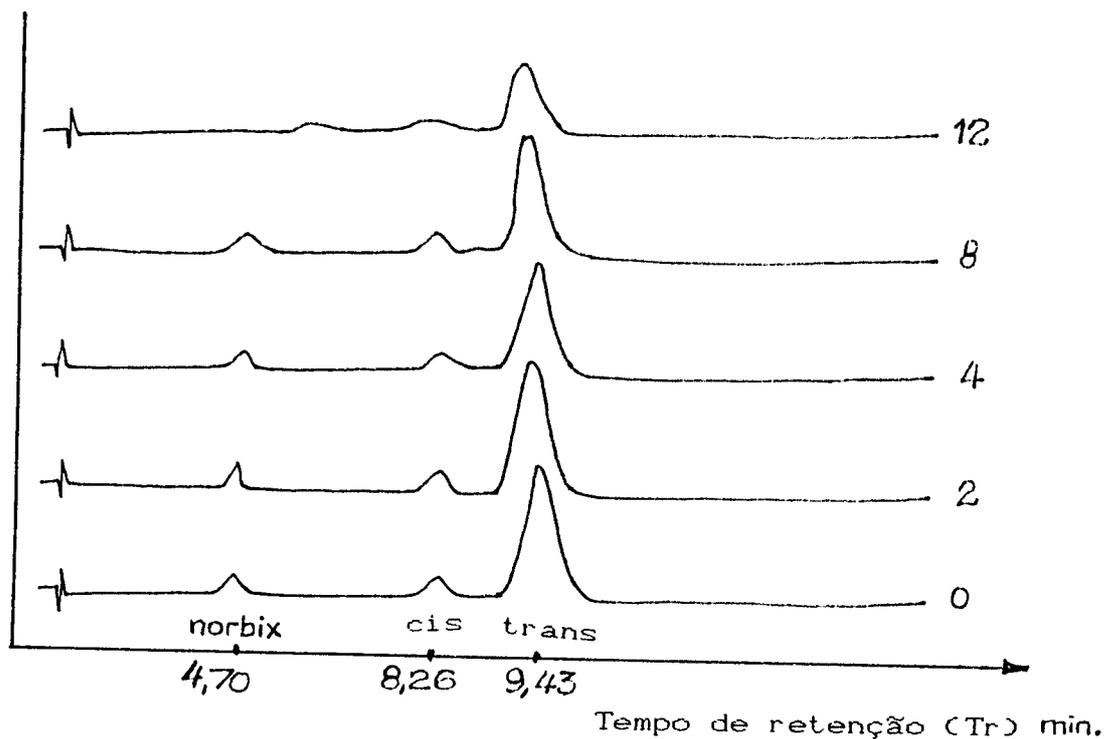


Figura 23- Cromatogramas (CLAEE) do extrato obtido em pH 11,22 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

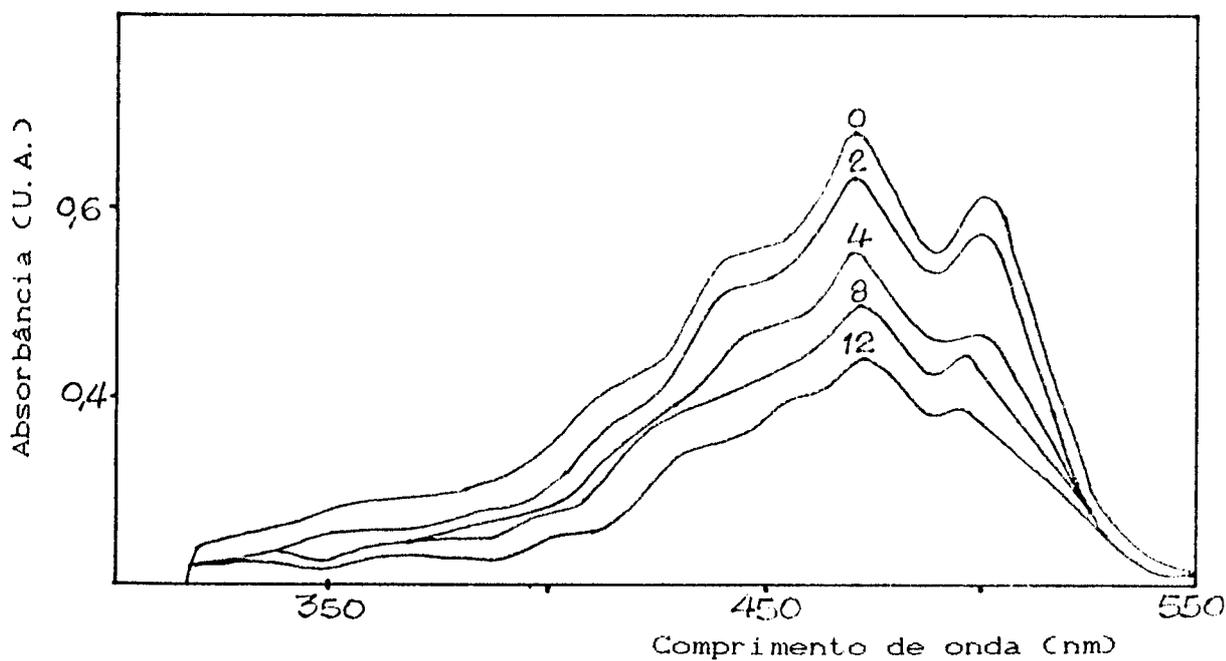


Figura 24- Espectros de absorção do extrato obtido em pH 12,52 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

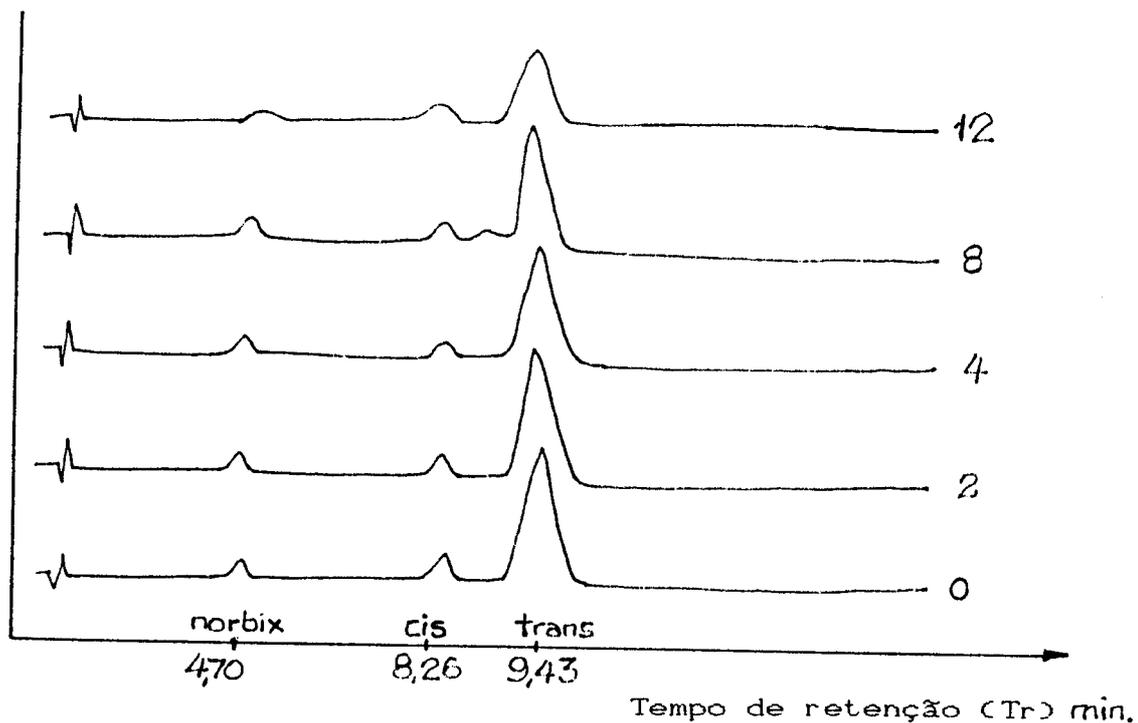


Figura 25- Cromatogramas (CLA) do extrato obtido em pH 12,52 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

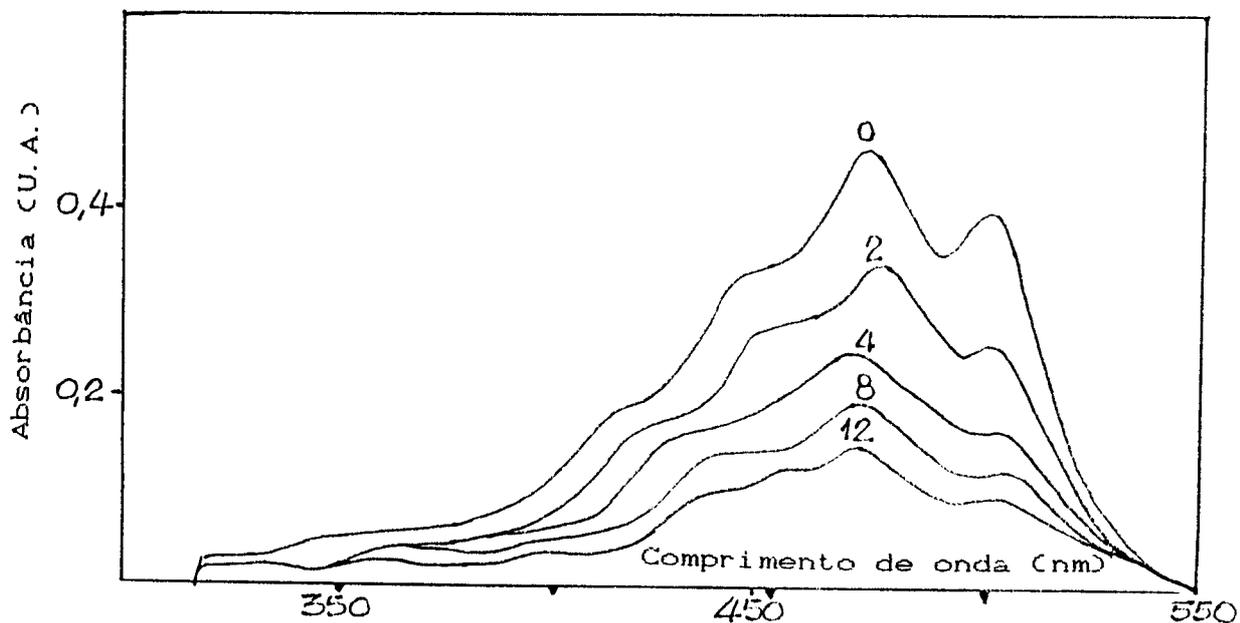


Figura 26- Espectros de absorção do extrato obtido em pH 13,49 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

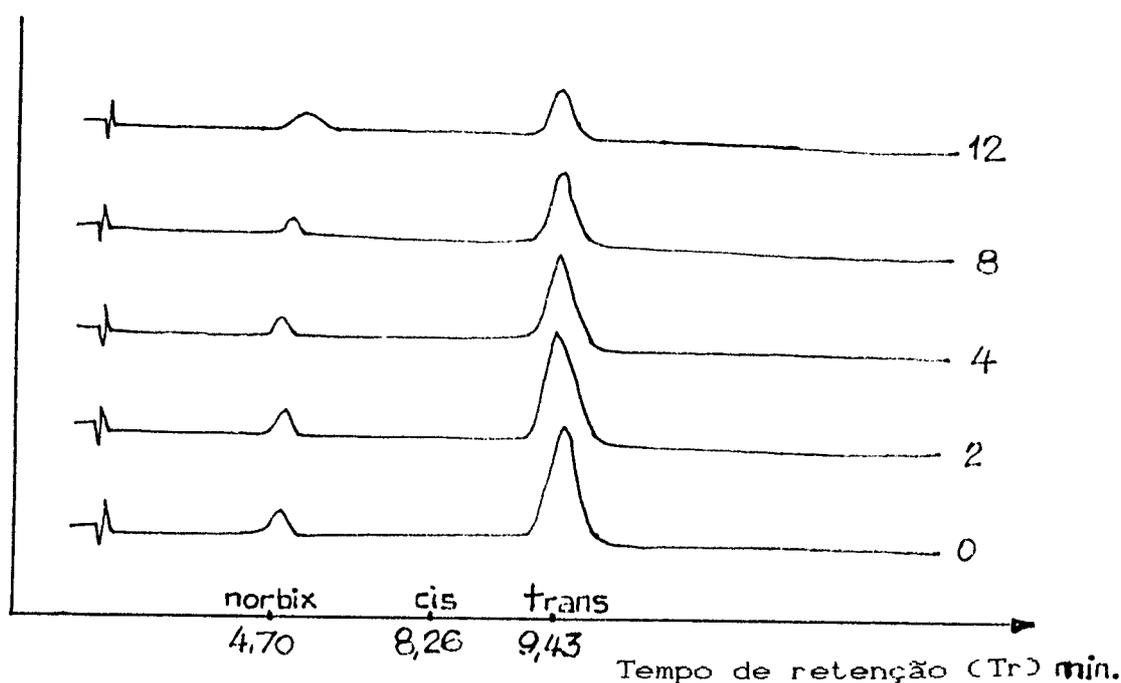


Figura 27- Cromatogramas (CLAE) do extrato obtido em pH 13,49 e aquecido a 105°C, por 0,2,4,8 e 12 horas.

Ao analisar os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, para valores de pH mais altos, pode-se verificar que o teor de *cis*-bixina com o tempo de retenção (Tr) de 8,26 minutos foi diminuindo, enquanto que a *trans*-bixina com o Tr de 9,43 minutos aumentou. Para tempos de exposição maiores, quando maiores quantidades de hidróxido de sódio foram utilizadas na extração inicial, obteve-se uma quantidade inversamente proporcional para os isômeros de bixina. A *cis*-bixina diminuía à medida que a *trans*-bixina aumentava, no extrato E Conde apresentou somente *trans*-bixina), a queda foi elevada, 40,9% no início e 14,6% depois de 12 horas de exposição à temperatura de 105°C, respectivamente. FRANCIS (1987) afirma que a bixina normalmente aparece na forma *cis* e uma porcentagem dela é modificada para *trans*, mas isso ocorre em pH abaixo de 10.

No presente estudo, todos os extratos utilizados foram obtidos a temperatura ambiente para evitar a formação de produtos de degradação que diminuem o poder tintorial do corante. Deste modo, observou-se que as extrações com pH inferior a 11 apresentam como pigmento principal a *cis*-bixina que é parcialmente isomerizada a *trans*-bixina pelo aquecimento do extrato (Figuras 19 e 21).

Em pH 11 e em extrações mais alcalinas, observa-se um aumento na concentração do isômero *trans* (Figuras 23, 25 e 27), que em pH 13 apresenta-se em concentrações superiores às dos outros pigmentos. Segundo WOOD et alii (1991), a *trans*-bixina apresenta solubilidade em óleo, superior ao isômero *cis*, o que torna bastante interessante a extração do pigmento em pH 13,49 no presente trabalho, para obtenção do corante de urucum lipossolúvel.

As equações de regressão linear que melhor descrevem o tratamento térmico entre 0 e 12 horas são:

$$\begin{aligned} \text{(pH 09,89)} \quad & -\ln C = 0,5124 + 0,0386t \\ & r^2 = 0,7490 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{(pH 10,74)} \quad & -\ln C = 0,5016 + 0,0389t \\ & r^2 = 0,6034 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{(pH 11,22)} \quad & -\ln C = 0,7228 + 0,1265t \\ & r^2 = 0,9784 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{(pH 12,52)} \quad & -\ln C = 0,6668 + 0,0708t \\ & r^2 = 0,9027 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{(pH 13,49)} \quad & -\ln C = 0,9842 + 0,0815t \\ & r^2 = 0,9570 \end{aligned}$$

onde C = concentração de bixina (%) e t = tempo (horas)

As taxas de degradação de bixina nos extratos A e B foram de 0,03865 e 0,0389% de bixina por hora de tratamento térmico,

respectivamente. Essas taxas não diferiram significativamente entre si, embora a perda imediata tenha sido maior para o extrato B (obtido a pH 10,74).

A partir do extrato C (pH de purificação 11,22), pode-se observar que o teor de bixina total começa a reduzir. As taxas de degradação de bixina para os extratos C, D e E mostradas pelas equações de regressão linear foram de 0,1265, 0,0708 e 0,0815% de bixina por hora de tratamento térmico, respectivamente. As taxas diferem significativamente entre si.

A Tabela 29 resume as constantes da velocidade de reação (aparentemente de primeira ordem) e o tempo de meia-vida para degradação da bixina a 105°C, obtidos a partir das equações 1 e 2 do item 3.7.5.

Tabela 29- Constantes da velocidade de reação (K) e meia-vida ($t_{1/2}$) para degradação da bixina a 105°C, no extrato obtido por método alcalino.

Condições experimentais (*)	$K \times 10^{-3}$ (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
A	38,6	17,96
B	38,9	17,82
C	126,5	5,48
D	70,8	9,79
E	81,5	8,50

* % de NaOH na extração = A (0,2), B (0,3), C (0,4), D (0,5) e E (0,6)

Ao analisar os resultados obtidos para estabilidade a 105°C a partir do extrato obtido por método alcalino, pode-se observar que os extratos A e B apresentaram tempo de meia-vida similar (17,96 vs. 17,82 horas, respectivamente). Já os outros extratos, apresentaram tempos menores de meia-vida, com 5,48, 9,79 e 8,50 horas para os extratos C, D e E, respectivamente.

A estabilidade da bixina ao calor está relacionada com o teor de *cis* ou *trans*-bixina existente inicialmente; o teor desses isômeros está relacionado com o método empregado para obtenção dos extratos.

4.7.1.2. EXTRATOS OBTIDOS POR METODOLOGIA ACIDA.

Os resultados obtidos com os extratos purificados de bixina obtidos com o método ácido a partir do extrato-base de urucum (item 3.3.3.1), foram quantificados por espectrofotometria (Figuras 28 e 30) e cromatografia líquida de alta eficiência (Figuras 29 e 31). Eles mostram o comportamento de dois extratos, purificados a 35 e 40°C respectivamente (E35 e E40) e aquecidos a 105°C, por 0, 8, 16 e 24 horas.

A quantificação feita para comparar os rendimentos obtidos, está apresentada na Tabela 30.

Tabela 30- Estabilidade à temperatura apresentada pelos extratos obtidos por método ácido aquecidos a 105°C por 0, 8, 16 e 24 horas.

Extrato	Tempo (horas)	Quantidade de bixina (%)
E35	0	94,7
E35	8	23,3
E35	16	5,1
E35	24	0,3

E40	0	90,9
E40	8	56,3
E40	16	39,1
E40	24	29,1

E35 = extrato obtido a 35°C

E40 = extrato obtido a 40°C

Pode-se observar que os dois extratos tem um teor similar de bixina no tempo zero (94,7 e 90,9% para os extratos E35 e E40, respectivamente). A diferença entre os dois extratos

apareceu quando eles foram submetidos ao aquecimento por 8 horas; inicialmente ambos apresentavam coloração vermelho escura. Depois se modificaram, não muito no extrato E40 mas marcadamente no E35, este último modificou o tom até laranja, enquanto o E400 ainda conservava tom vermelho distinto. Depois da determinação espectrofotométrica, extrato E35 teve o teor de bixina reduzido até 23,3%, enquanto que no extrato E40 ele reduziu para 56,3%. Outra diferença foi a solubilidade em clorofórmio, seriamente afetada no E35.

A degradação continuou após 16 horas com 5,1 e 39,1 de bixina (em E35 e E40, respectivamente) e após 24 horas quase desapareceu em E35, decrescendo para 0,3% e em E40 o teor atingiu 29,1%. A coloração do E35 passou para um tom creme, quase branco, mas no E40 manteve a coloração laranja.

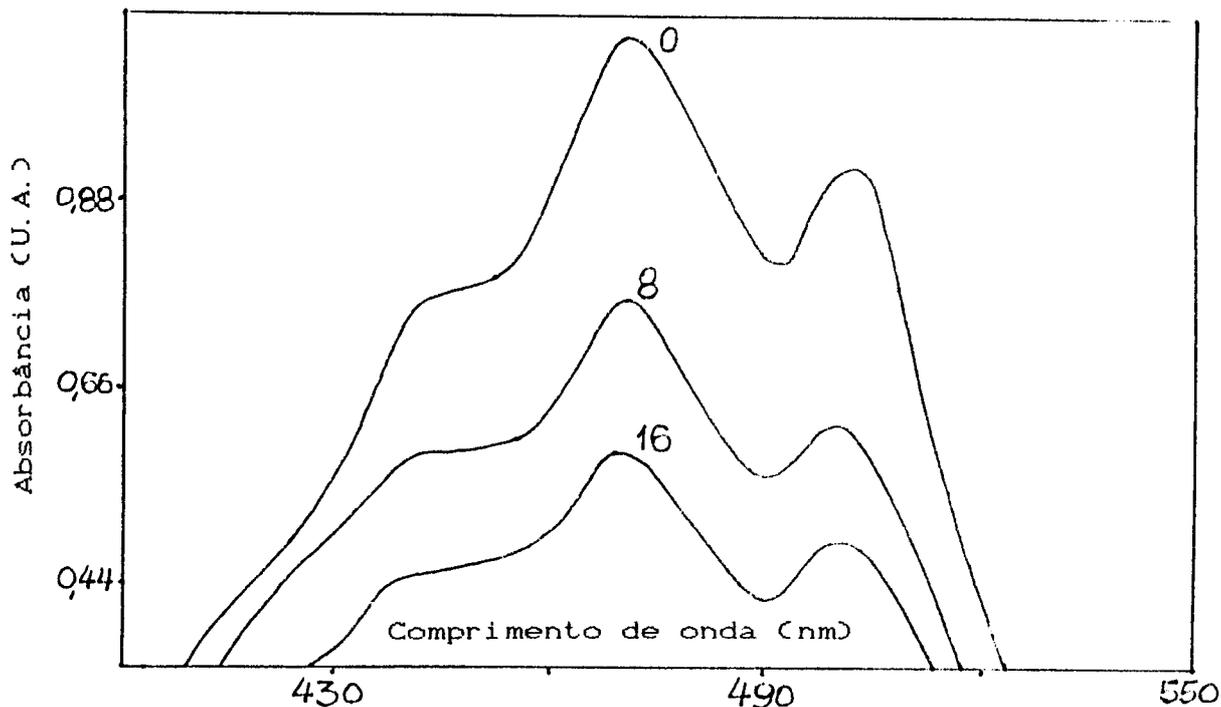


Figura 28- Espectros de absorção do extrato obtido a 35°C e aquecido a 105°C, por 0, 8, 16 e 24 horas.

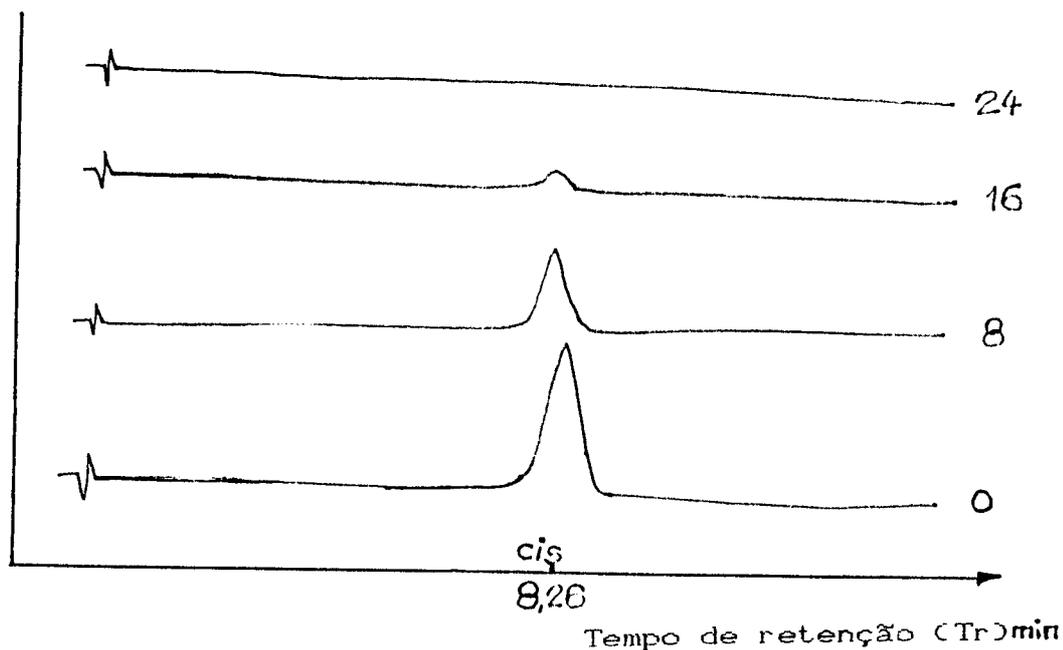


Figura 29- Cromatogramas (CLAED) do extrato obtido a 35°C e aquecido a 105°C, por 0,8,16 e 24 horas.

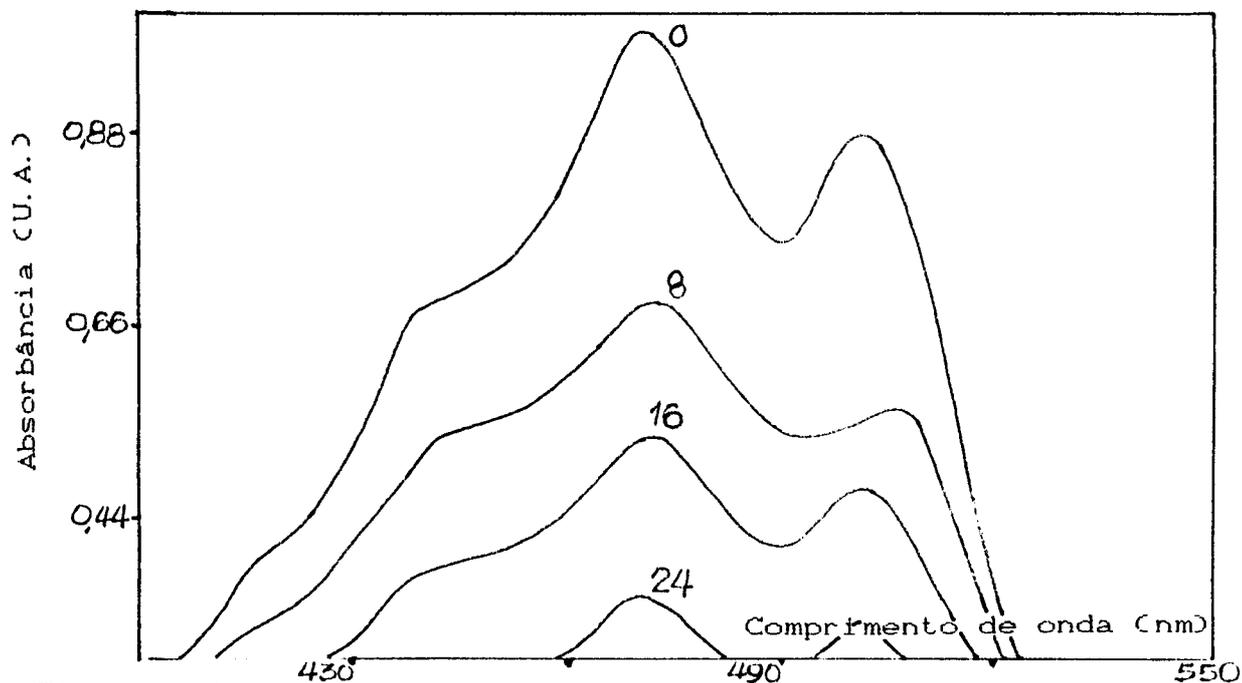


Figura 30- Espectros de absorção do extrato obtido a 40°C e aquecido a 105°C, por 0,8,16 e 24 horas.

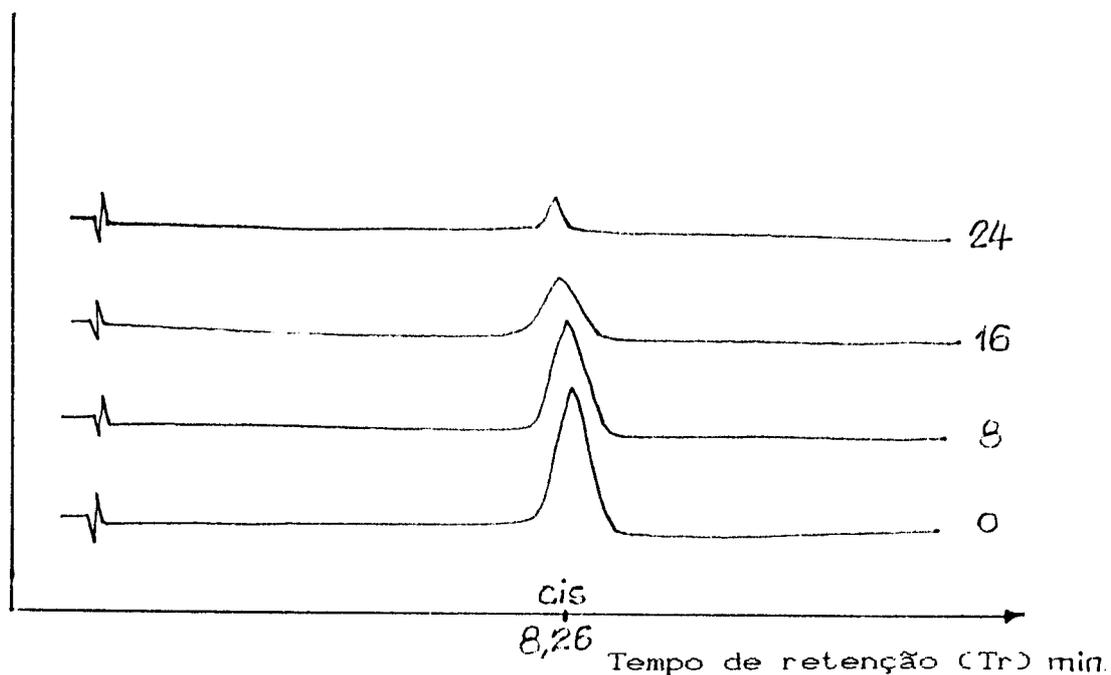


Figura 31- Cromatogramas (CLAE) do extrato obtido a 40°C e aquecido a 105°C, por 0,8,16 e 24 horas.

Segundo McKEOWN & MARK (1962), a bixina encontra-se na natureza na forma *cis*, que é muito instável mas quando as condições iniciais são alteradas, muda para a forma *trans*. ISLER (1971) complementa afirmando que a bixina é o éster monometílico de um ácido dicarboxílico C₂₄, e pesquisas estereoquímicas tem demonstrado que ele contém uma ligação dupla *cis* e a isomerização deste produto natural dará o isômero *trans*.

Os extratos E35 e E40 após 24 horas de tratamento térmico possuem uma coloração diferente (creme e laranja, respectivamente), concordando com McKEOWN (1965) segundo o qual a degradação térmica da bixina forma um pigmento amarelo, identificado como 13-carbometoxi-4,8-dimetil tridecahexaenoico. A análise dos

espectros de absorção (Figuras 28 e 30) e os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (Figuras 29 e 31), verificou que o extrato E35 degradou mais que o E40, após 24 horas a 105°C.

Depois de analisar os dados, as equações de regressão linear que melhor descrevem o tratamento térmico entre zero e 24 horas foram:

$$\begin{aligned} \text{Extrato obtido a } 35^{\circ}\text{C:} & \quad -\ln C = -0,2180 + 0,2301t \\ & \quad r^2 = 0,9725 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Extrato obtido a } 40^{\circ}\text{C:} & \quad -\ln C = 0,1439 + 0,0472t \\ & \quad r^2 = 0,9880 \end{aligned}$$

onde: C = concentração de bixina (%) e t = tempo (horas)

No extrato E35, aquecido a 105°C, houve degradação de 0,2301% de bixina/hora de tratamento. No extrato E40, a degradação foi de 0,0472% de bixina/hora de tratamento. Sendo a diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Tukey igual a 0,0347, tem-se que no extrato E35 a degradação de bixina a 105°C foi significativamente superior à ocorrida no extrato E40.

De acordo com GOODWIN (1976), quando pouco ou nenhum calor for aplicado para a purificação (normalmente temperaturas abaixo de 40°C), não devem acontecer mudanças na isomeria deste carotenóide. Devido à termolabilidade de muitos carotenóides, especialmente as xantofilas (por exemplo, bixina) o aquecimento deve ser feito apenas quando absolutamente necessário na manipulação desses pigmentos (DAVIES, 1976). Pela instabilidade de muitos carotenóides, as soluções de extração não devem ser aquecidas mais que o necessário (MOSS & WEEDON, 1976).

Isso poderia ajudar a compreender a diferença entre os extratos purificados E35 e E40, porque o primeiro foi aquecido a uma temperatura inferior à mencionada na literatura (35°C), enquanto que no outro a temperatura atingiu 40°C. Por isso no extrato E35 prevaleceu a *cis*-bixina lábil, enquanto que no E40 a quantidade de *trans*-bixina estável foi maior.

A Figura 32 mostra a perda de cor apresentada pelos extratos purificados obtidos a 35°C e aquecidos a 105°C, por 0, 8, 16 e 24 horas, em comparação com os extratos a 40°C.

De acordo com MAYER (1943), os carotenóides podem sofrer mudanças com a temperatura, possivelmente relacionadas, no caso da bixina, com a formação de ácidos carboxílicos aromáticos monocíclicos (por exemplo, ácido *m*-toluico dos finais das cadeias dos ácidos carboxílicos dos carotenóides). Por isto, as quantidades relativas de bixina e seus produtos de isomerização e degradação em preparações comerciais de urucum variam dentro de amplos limites, dependendo das condições do processamento, com marcadas diferenças em suas propriedades corantes, na faixa que vai do amarelo ao laranja avermelhado (McKEOWN & MARK, 1962). Estes afirmam que consideráveis quantidades de pigmentos, diferentes da bixina, podem estar presentes nas preparações de urucum e não ser derivados das sementes de urucum, mas formados durante o processo da extração, pois a bixina dissolvida em solventes sofre uma série complexa de reações de isomerização e degradação, quando esquentada a elevadas temperaturas de extração, dando formação a um pigmento amarelo.

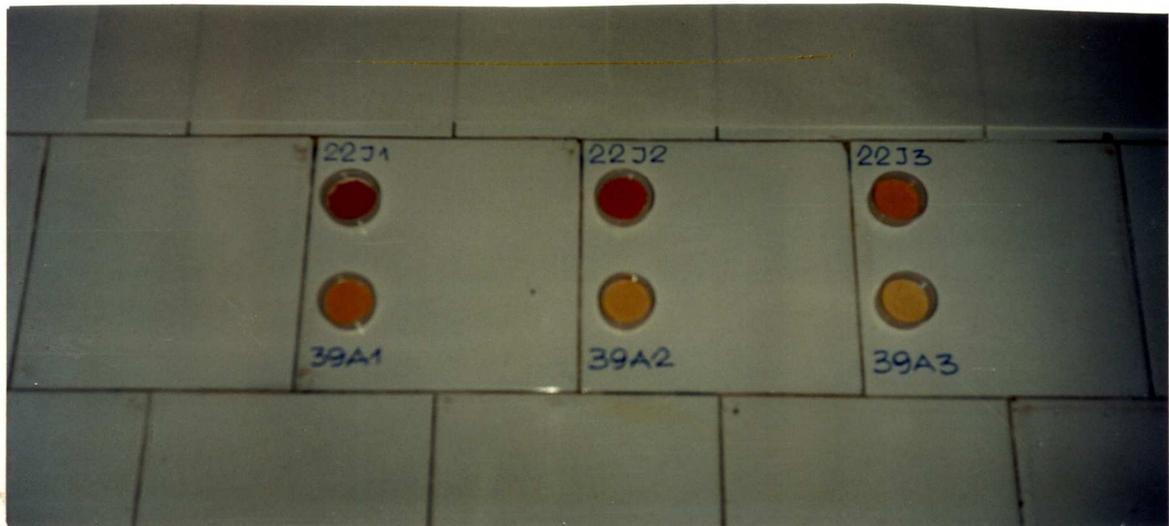


Figura 32- Perda de bixina apresentada pelos extratos purificados de bixina obtidos a 35°C (39A) e 40°C (22J) e aquecidos a 105°C por 8,16 e 24 horas.

Extrato 39A1 = 8 horas, 39A2 = 16 horas, 39A3 = 24 horas.

Extrato 22J1 = 8 horas, 22J2 = 16 horas, 22J3 = 24 horas.

A Tabela 31 resume as velocidades das reações (aparentemente de primeira ordem) e o tempo de meia-vida para os diversos tratamentos, obtidos a partir das equações 1 e 2 do item 3.7.5.

Tabela 31- Constantes da velocidade de reação (K) e meia-vida ($t_{1/2}$) para degradação da bixina no extrato obtido por meio ácido, a 105°C.

Condições experimentais	$K \times 10^{-3}$ (h^{-1})	$t^{1/2}$ (h)
E35	230,1	3,01
E40	47,2	14,69

E35 = extrato obtido a 35°C

E40 = extrato obtido a 40°C

Analisando os resultados obtidos para estabilidade a 105°C a partir do extrato obtido por método ácido, observou-se que

a degradação da bixina no extrato E35 foi aproximadamente 4,9 vezes mais rápida que no extrato E40. Finalmente ROCKLAND & NISHI (1980) afirmam que mudanças na temperatura, ou outros fatores que influenciem a atividade de água, podem induzir mudanças na qualidade e estabilidade de um produto alimentício, no qual o cálculo da atividade de água é um meio simples para avaliar a capacidade ligante da água.

4.7.3. DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE UMIDADE.

A Figura 33 mostra as isotermas de adsorção de umidade utilizando duas amostras: extrato purificado de bixina obtido por precipitação (item 3.3.3.1), denominado "L", e extrato hidromiscível de bixina obtido por atomização (item 3.5), denominado "H".

Utilizando diferentes soluções de ácido sulfúrico em várias concentrações, estabelecidas previamente segundo a Tabela 15, foram obtidas as curvas de isotermas de adsorção de umidade para os dois extratos. As curvas foram construídas a partir da Tabela 32.

A umidade crítica das amostras, indicando o início do "caking" ou aglomeração, para extrato purificado de bixina e extrato hidromiscível de urucum, foi de 5,50 e 3,25 g água/100g de amostra seca, respectivamente. Estes dados, posteriormente, podem ser utilizados no planejamento de embalagens específicas para determinados alimentos, considerando que são amostras com baixo teor de umidade.

Segundo ROCKLAND & NISHI (1980), a atividade de água está mais relacionada com as propriedades físicas, químicas e biológicas dos alimentos e outros produtos naturais, que o teor de umidade total, e mudanças específicas na estabilidade da cor destes têm sido associadas com mudanças de atividade de água relativamente pequenas.

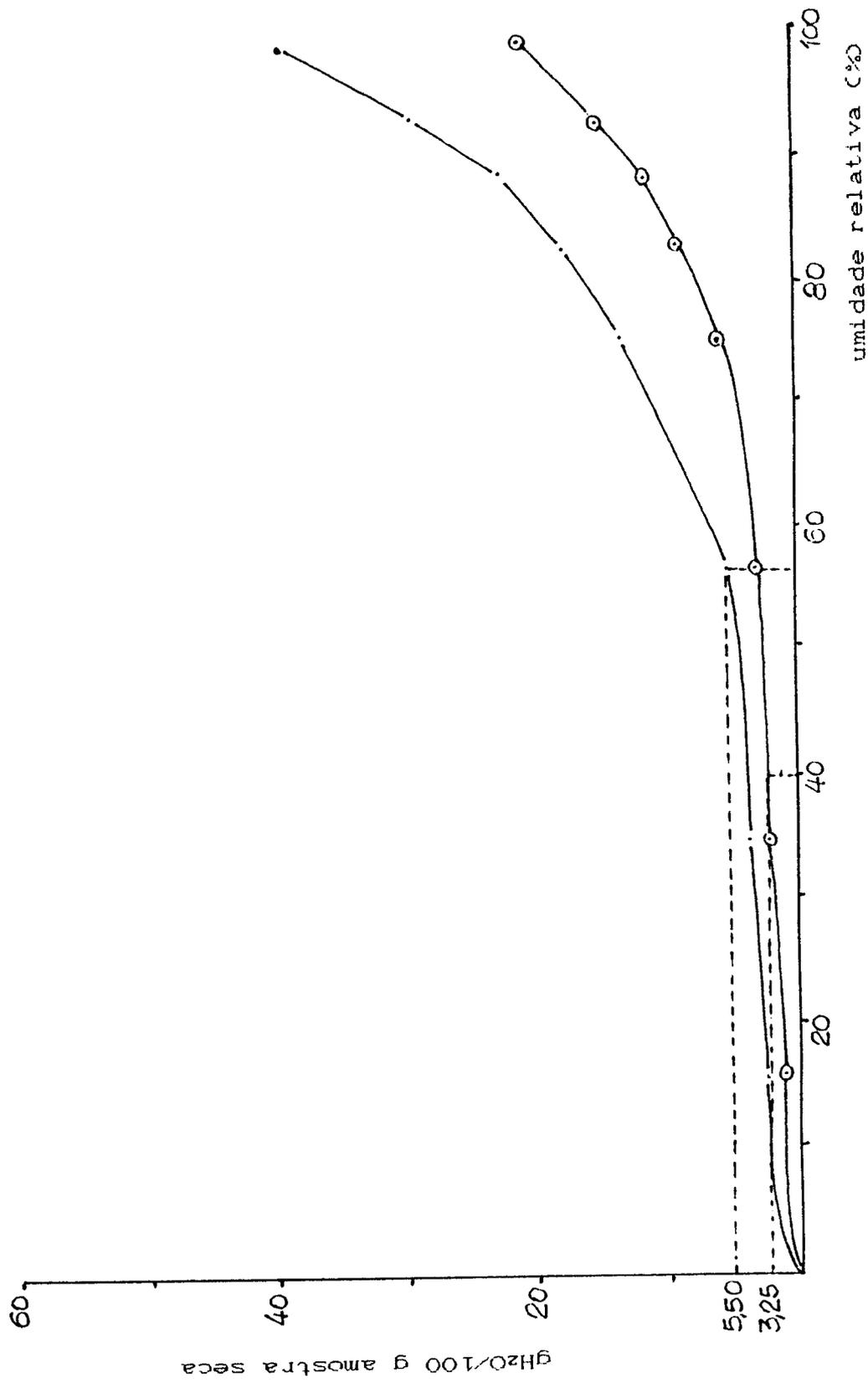


Figura 33 - Isothermas de adsorção (obtidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$) de extrato purificado de bixina (L) e extrato hidromiscível de bixina (H), com umidade crítica de 5,50 e 3,25 g $\text{H}_2\text{O}/100\text{g}$ de amostra seca, respectivamente.

TABELA 32- Determinação das isotermas de adsorção para extratos purificado (L) e hidromiscível (H) de bixina.

Placa N°	Peso pl. vazia	Peso pl. + am. úmida	Peso pl. + am. seca	Peso pl. + am. equil.	* Peso am. seca	** Aumento peso	*** gH ₂ O/100g a. s
1L	16,8255	17,8653	17,8392	17,8501	1,0137	0,0261	2,57
1H	18,0350	19,0653	19,0149	19,0216	0,9799	0,0051	0,67
2L	18,2488	19,3515	19,3243	19,3636	1,0755	0,0393	3,65
2H	17,5639	18,5841	18,5244	18,5495	0,9656	0,0200	2,07
3L	17,8548	18,8914	18,8753	18,9284	1,0205	0,0531	5,20
3H	14,3072	15,3243	15,2728	15,3074	0,9656	0,0346	3,58
4L	17,1179	18,1387	18,1210	18,2607	1,0031	0,1397	13,93
4H	14,5332	15,5761	15,5261	15,5906	0,9929	0,0645	6,50
5L	17,3091	18,3235	18,3088	18,4923	0,9997	0,1835	18,35
5H	22,3444	23,3808	23,3198	23,4171	0,9754	0,0973	9,97
6L	18,0661	19,0806	19,0595	19,2899	0,9934	0,2304	23,19
6H	17,0392	18,0725	18,0217	18,1371	0,9825	0,1154	11,75
7L	15,3272	16,3298	16,3100	16,6085	0,9828	0,2985	30,37
7H	17,3182	18,3562	18,3015	18,4572	0,9833	0,1557	15,83
8L	19,3811	20,4177	20,3997	20,8065	1,0186	0,4068	39,94
8H	17,6158	18,6393	18,5801	18,7926	0,9643	0,2125	22,04

onde:

- * peso amostra seca = (peso placa + amostra seca) - peso placa vazia
- ** aumento peso = [(peso pl. + am. equil.) - peso placa vazia] - peso am. seca
- *** g H₂O/100 g de amostra seca = aumento peso / peso amostra seca

O conhecimento dos teores de umidade inicial e da umidade crítica, bem como a correta determinação de uma isoterma de adsorção de umidade, são informações essenciais na escolha de uma embalagem que ofereça ao produto o período máximo de vida útil, em função da permeabilidade ao vapor de água da embalagem que o acondicionará (CARVALHO et alii, 1993).

5. CONCLUSÕES

1- Foi obtido um extrato purificado de bixina com elevado grau de pureza e de concentração conhecida (94,7% de bixina), viável tecnicamente para uso na indústria de alimentos.

2- Nas condições do trabalho, a mistura acetona-isopropanol (1:1) foi a mais apropriada para purificar os diferentes extratos de urucum, pois foi o solvente que extraiu a maior quantidade de bixina (94,7%).

3- Na purificação dos extratos de urucum por precipitação, a maior quantidade de bixina e o maior rendimento de obtenção foram obtidos a 35°C.

4- É possível obter um extrato de urucum de alto teor de bixina (73,4%), pelo método alcalino de extração em temperatura ambiente (25 ± 2°C).

5- A purificação dos extratos em meio ácido produziu extratos finais com maior quantidade de bixina do que a purificação em meio alcalino (94,7 vs. 73,4%, respectivamente).

6- Foi desenvolvido um método integrado de extração e purificação a partir de sementes de urucum que proporcionou bons rendimentos e maior facilidade operacional na obtenção de um extrato purificado de urucum.

7- O emprego de emulsificantes permitiu obter emulsões estáveis e solúveis em água, utilizando extratos purificados de bixina. A estabilidade da emulsão depende do emulsificante usado.

8- A bixina presente no extrato hidromiscível de urucum se mostrou mais estável à luz que a bixina purificada a partir do extrato-base de urucum.

9- A taxa de degradação a 105°C apresentada pelos extratos de bixina obtidos por metodologia ácida, foi maior quanto mais elevado o seu teor inicial de bixina.

10- Com base na umidade crítica encontrada na determinação das isotermas de adsorção, a capacidade de absorção de água do extrato hidromiscível de urucum é maior que a do extrato purificado de bixina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, A.O. - A ação protetora do urucú. *Bol. Museu Nac.*, 7(1):3-8. 1931.
2. AMPIÉE, M. - Investigación cualitativa de vitamina y provitamina A en el achiote. *Rev. Biol. Trop.*, 4(2):227-33. 1956.
3. ANAND, N. - *The market of annatto and other natural colouring materials, with special reference to the United Kingdom.* London, Tropical Development and Research Institute, 1983. 29 p.
4. ANGELUCCI, E. - Corantes naturais versus corantes artificiais. Vantagens e desvantagens. In: Carvalho, P.R.N.; coord. *Seminários: Corantes para Alimentos. Resumos.* Campinas, ITAL. 1989. p. 8-10.
5. ANGELUCCI, E.; ARIMA, H.K.; KUMAGAI, E.A. - Urucú. I- Dados preliminares sobre a composição química. *Col. Inst. Tecnol. Alim.*, 11:89-96. 1980.
6. AOAC - *Official Methods of Analysis.* 15th ed. Arlington, Association of Official Analytical Chemists. 1990. 684 p.
7. ARANA, E.R. & ITURBE, G.A. - Determinación de las isotermas de sorción a tres temperaturas en dos variedades de maíz y trigo, su ajuste a modelos matemáticos y el estudio preliminar de las condiciones de almacenamiento. 1a. Parte. Determinación de las isotermas y su ajuste a modelos matemáticos. *Tec. Aliment. (Méx.)*, 24(1):4-13. 1988.

8. ARAYA, H.H.; MURILLO, M.R.; VARGAS, E.G.; DELGADO, J.M. - Composición y empleo del achiote (*Bixa orellana* L.) en raciones para gallinas ponederas, para la pigmentación de la yema del huevo. *Agron. Costarric.*, 1(2):143-50. 1977.
9. ARIMA, H.K.; ANGELUCCI, E.; MATTOS, S.V.M. - Urucum. II. Comparação de métodos cromatográficos para a separação dos carotenóides. *Colet. Inst. Tecnol. Alim.*, 11:97-106. 1980.
10. AUSLANDER, D.E.; GOLDBERG, M.; HILL, J.A.; WEISS, A.L. - Naturally occurring colorants: a stability evaluation. *Drug & Cosmet. Ind.*, 121(6):55-6. 1977.
11. AVILA, A.M.; BARQUERO, L.; CALZADA, J. - An improved method for determination of bixin in annatto seeds. *Ingen. Cienc. Quím.*, 6(3-4):209-10. 1982.
12. AZEVEDO, G.W. - Implantação agrícola do urucueiro. A nova opção. Saquarema, Fazenda São Lourenço. 1981. 67 p.
13. BAHL, C.P.; SESHADRI, T.R.; VEDANTHAM, T.N.C. - Preparation of bixin and methylbixin from Indian seeds of *Bixa orellana*. *Cur. Sci.*, 2: 27-8. 1971.
14. BAUERNFEIND, J.C.; BRUBACHER, G.B.; KLÄUI, H.M.; MARUSICH, W.L. - Use of carotenoids. In: Isler, O., ed., *Carotenoids*. Basel, Berkhauser Verlag, 1971, p. 758.
15. BEATUS, Y.; RAZIEL, A.; ROSEMBERG, M.; KOPELMAN, I.J. - Spray-drying microencapsulation of Paprika oleoresin. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 18(1):28-33, 1985.
16. BECHER, P. & YUDENFREUND, M.N. - *Emulsions, latices and dispersions*. New York, Marcel Dekker Inc. 1978, 329 p.
17. BENTLEY, K.W. - *The Natural pigments*. New York, Interscience Publishers Inc. 1960, p. 236-46.

18. BERSET, C. & MARTY, C. - Utilisation potentielle de l'annatto en cuisson-extrusion. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 19(2): 126-31. 1986.
19. BHALKAR, S.V. & DUBASH, P.J. - Methods of extraction of annatto from the seeds of *Bixa orellana*. *Ind. J. Dair. Sci.*, 36(2):157-61. 1983.
20. BRADLEY, D.G. & MIN, D.B. - Singlet oxygen oxidation of foods. *Crit. Rev. Food Sci. & Nutrit.*, 31(3):211-36. 1992.
21. BRAY, W.H. - Water vapor pressure control with aqueous solutions of sulfuric acid. *J. Mater.*, 5(1):223-48. 1970.
22. BRITTON, G. - Biosynthese of carotenoids. In: GOODWIN, T.W., coord. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London, Academic Press. 1976. v.1, p. 262-319.
23. CARVALHO, P.R.N. - Urucum. Determinação de bixina e norbixina em extratos. In: *Seminários: Corantes para Alimentos. Resumos*. Campinas, ITAL/SBCTA. 1988. p. 69-75.
24. CARVALHO, P.R.N. & HEIN, M. - Urucum - Uma fonte de corante natural. *Col. Inst. Tecnol. Alim.*, 19(1):25-33. 1989.
25. CARVALHO, P.R.N.; SARANTOPOULOS, C.I.G.L.; SHIROSE, I.; SILVA, M.G.da - Estudo de vida-de-prateleira do corante (bixina) extraído das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.). *Colet. Inst. Tecnol. Alim.*, 23(1):98-104. 1993
26. CHAO, R.R.; MULVANEY, E.J.; SANSON, D.P.; HSIEH, F.H.; TEMPESTA, M.S. - Supercritical CO₂ extraction of annatto (*Bixa orellana*) pigments and some characteristics of the color extracts. *J. Food Sci.*, 56(1):80-3. 1991.
27. CODEX - Report of the Ad Hoc Working Group on Processing Aids. CX/FA 84/12 Add 3 Part I. Codex Alimentarius

Commission. 1984.

28. COLLINS, P. - **Annatto Legislation in Europe**. Swadlincote, Overseal Foods Ltd. 1991. 17 p.
29. CUNHA, L.G.C.; FREIRE, J.M.; FARIAS, E. - Diagnóstico da cultura do urucu (*Bixa orellana*) na Ibiapaba. Fortaleza, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará. 1978. 37 p.
30. CZINKOTAI, B.; DAOOD, H.; BIACS, P.A. - Analysis of carotenoids from paprika by HPLC. **Chromatography**, 10(1):4-5. 1989.
31. DAMASCENO, V. - Guerra aos sintéticos ressuscita os naturais. **Química e Derivados**, 250:10-20. 1988.
32. DAVIES, B.H. - Carotenoids. In: GOODWIN, T.W., coord. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London, Academic Press. 1976. v.2., p. 38-155.
33. DEGNAN, A.J.; VON ELBE, J.H.; HARTEL, R.W. - Extraction of Annatto seed pigment by supercritical carbon dioxide. **J. Food Sci.**, 56(6):1655-9. 1991.
34. DENDY, D.A.V. - Annatto, the pigment of *Bixa orellana*. **East Afr. Agric. For. J.**, October:126-32. 1966.
35. DENDY, D.A.V. - The assay of annatto preparations by thin-layer chromatography. **J. Sci. Food Agric.**, 17:75-6. 1968.
36. DENNER, W.H.B. - Food additives: recommendations for harmonization and control. **Food Control**, 1(3):150-62. 1990.
37. DIEMAIR, W.; JANECKE, H.; HEUSSER, D. - Pigments of *Bixa orellana*. **Naturwissenschaften**, 39:211. 1952.
38. DUPAIGNE, P. - Les colorants rouge d'origine naturelle.

Fruits, 29(12):794-814. 1974.

39. DZIEZAK, J.D. - Applications of food colorants. Food Technol., 41(4):78-88. 1987.
40. ENGELHARDT, J.; ROED, B.L.; DIDRIKSEN, C. - Annatto. The natural color of choice in modern food industry. NATCOL. Quart. Inf. Bull., 2:4-10. 1988.
41. ENOSHITA, L. - Corante de urucum. Alim. Tecnol., 1(8):26. 1986.
42. E.U.A. Pat. 2,815,287. H.M. Barnett. Process for extracting the coloring matter from annatto seeds. December 3, 1957.
43. E.U.A. Pat. 2,830,908. M.A. Perret & R. Park. Food color and method for preparing the same. April 15, 1958.
44. E.U.A. Pat. 2,831,775. R.B. Kocher. Edible annatto coloring composition for foods. April 22, 1958.
45. E.U.A. Pat. 2,861,891. J.C. Bauernfeind & R.H. Bunnell. Water dispersible carotenoid compositions and process of making the same. November 25, 1958.
46. E.U.A. Pat. 4,204,043. W.G. Schultz. Method from removing pigment from annatto seed. May 20, 1980.
47. E.U.A. Pat. 4,380,553. T.R. Schmidt. Method for imparting a reddish color to seasoning salts. April 19, 1983.
48. E.U.A. Pat. 4,548,822. T.R. Schmidt. Acid soluble annatto colorant in a powdered form. October 22, 1985.
49. EWING, G.W. - Métodos Instrumentais de Análise Química. São Paulo, Edgard Blücher Ltda., 1972. 398-413.
50. FALESI, I.C. - A cultura do urucú no norte do Brasil. In: Carvalho, P.R.N. & Yabiku, H.Y.; coord. III Seminário de

Corantes Naturais para Alimentos e I Simpósio Internacional de Urucum. Resumos. Campinas, ITAL. 1991. p. 101-2.

51. FAO/WHO - Specifications for identity and purity of some food colours, flavor enhancers, thickening agents and certain food additives. Rome, WHO Food Additives Series 7. 1976. 111 p.
52. FAO/WHO - Specifications for identity and purity of buffering agents, salts emulsifiers, thickening agents, stabilizers, flavoring agents, food colors, sweetening agents and miscellaneous food additives. Rome, FAO Food and Nutrition Paper 25. 1982.
53. FISHER, C. & KOCIS, J.A. - Separation of Paprika pigments by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 35:55-7. 1987.
54. FRANCIS, B.J. - The separation of Annatto pigments by thin layer chromatography with special reference to the use of analytical-grade reagents. *Analyst*, 90:374. 1965.
55. FRANCIS, F.J. - Lesser-known food colorants. *Food Technol.*, 41(4):62-88. 1987.
56. FREUND, P.R.; WASHAM, C.J.; MAGGION, M. - Natural color for use in foods. *Cer. Foods World*, 33(7):553-9. 1988.
57. GHIRALDINI, J.E. - Produção e comercialização interna de corantes naturais para alimentos. In: Carvalho, P.R.N.; coord. *Seminário: Corantes Naturais para Alimentos. Resumos*. Campinas, ITAL. 1989. p. 21-5.
58. GODOY, H.T. - Estudo de carotenóides e pró-vitamina A em alimentos. Campinas, 1993. xviii, 185 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos). Fac. Eng. Alim. - Universidade Estadual de Campinas.

59. GOODWIN, T.W. - Distribution of carotenoids. In: GOODWIN, T.W., coord. *Chemistry and biochemistry of Plant pigments*. London, Academic Press. 1976. v.1, p. 225-61.
60. GOSE, E.B. - Dye-containing plants in the Dominican Republic. *Agricultura*, 37:87-90. 1946.
61. GUIMARÃES, I.S.; BARBOSA, A.L.S.; MASSARANI, G. - Nota sobre a produção de concentrado de bixina em leite de jorro. *CTAA/EMBRAPA*, :253-7. 1989.
62. GUIMARÃES, I.S.; BARBOSA, A.L.S.; MASSARANI, G. - Manufacture of a bixin concentrate in a spouted bed. *Rev. Bras. Engen. Quím.*, 12(2):22-3. 1989.
63. GUIMARÃES, I.S.; FERREIRA, L.M.J.; WILBERG, V.K. - Avaliação do teor de bixina durante a maturação dos frutos de urucum. In: Carvalho, P.R.N. & Yabiku, H.Y.; coord. *III Seminário de Corantes Naturais para Alimentos e I Simpósio Internacional de Urucum. Resumos*. Campinas, ITAL. 1991. p.143-4.
64. HABAJ, B. - Preparation of an annatto seed dye used for cheese. *Pol.*, 56:715. 1969.
65. HALLAGAN, J.B. - The use of certified food color additives in the United States. *Cer. Foods World*, 36(11):1945-8. 1991.
66. HASSELT, J.F.B. van - Mémoires et communications. Etude sur la constitution de la bixine. *Rec. Trav. Chim.*, 30:1-47. 1911.
67. HERNANDEZ, T.A.T.; TRUJILLO, R.L.; AREVALO, E. G.; HERNANDEZ, J.T. - *Sistemas de producción de achiote en la Amazonía Peruana*. Tingo María, PNUD. 1988. 84 p.
68. INGRAM, J.S. & FRANCIS, B.J. - The annatto tree (*Bixa orellana* L.)- A guide to its occurrence, cultivation, preparation and uses. *Trop. Sci.*, 11(2):97-103. 1969.

69. ISLER, O. - Introduction. In: Isler, O., ed., **Carotenoids**. Basel, Berkhauser Verlag, 1971, p. 12-25.
70. JAPÃO Pat. 60,184,566 [85,184,566] H. Tadamasa & A. Yasuda. **Bixin coloring matter**. September 20, 1988.
71. JARDIM, D.C.P. - Levantamento e aplicação de isoterma. In: Teixeira Neto, R.O., coord. **I Seminário sobre atividade de água em alimentos**. Campinas, ITAL. 1987. 18 p.
72. KARRER, P.; HELFENSTEIN, A.; WIDMER, R.; ITALLIE, T.B. van - Über Bixin. **Helvet. Chim. Acta**, 12:741-56. 1929.
73. KEARSLEY, M.W. & KATSABOXAKIS, K.Z. - Stability and use of natural colours in foods: red beet powder, copper chlorophyll powder and cochineal. **J. Food Technol.**, 15: 501-14. 1980.
74. KEARSLEY, M.W. & RODRIGUEZ, N. - The stability and use of natural colours in foods: anthocyanin, β -carotene and riboflavin. **J. Food Technol.**, 16:421-31. 1981.
75. KIMURA, I.A. & MAEDA, M. - Determinação de isoterma de adsorção de umidade: Influência da concentração da solução e da variação no volume do recipiente. **Bol. SBCTA**, 27(2):79-87 1993.
76. KUHN, R. & WINTERSTEIN, A. - Über konjugierte Doppelbindungen V. Bemerkungen zur konstitution des carotins und des Bixins. **Helvet. Chim. Acta**, 11:427-31. 1928.
77. KUHN, R. & EHMANN, L. - Über konjugierte Doppelbindungen XI. Über das Bixin und seinen Abbau zum Bixan. **Helvet. Chim. Acta**, 12:904-15. 1929.
78. LAURO, G.J. - A primer on Natural colors. **Cer. Foods World**, 36(11):1949-53. 1991.

79. LABUZA, T.P. - The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technol.*, April:36-41. 1980.
80. LIAAEN-JENSEN, S. - Isolation, reactions. In: Isler, O., ed., *Carotenoids*. Basel, Berkhauser Verlag, 1971, p. 61-188.
81. LIMA, J.A. de M. - O bom do urucum fica na cachopa. *O Globo Rural*, 2(13):90-1. 1986.
82. LIMA, L.C.F. - Mercado Sulamericano do urucú. In: Carvalho, P.R.N. & Yabiku, H.Y. *III Seminário de Corantes Naturais para Alimentos e I Simpósio Internacional de Urucum. Resumos*. Campinas, ITAL. 1991. 199-205.
83. LIMA, U.A. - Alcool etílico. *Problemas de energia no Brasil*. Brasília, IPEAC. 1976. p. 95-9.
84. LIN, C.S. - Evaluating the safety on food and color additives with pharmacokinetic data. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32 (2):191-5. 1992.
85. LUNDE, K. & ZECHMEISTER, L. - Infrared spectra and cis-trans configurations of some carotenoid pigments. *J. Amer. Chem. Soc.*, 77:1647-53. 1955.
86. MADI, L.F.C.; QUAIST, D.G.; SOLER, R.M.; GAZETA, E.F.; ORTIZ, S.A.; ALVIM, D.D.; CABRAL, A.C.D.; FERNANDES, M.H.C. - *Manual de projetos de embalagens para alimentos, com base na permeabilidade a gases e ao vapor de água*. Campinas, ITAL/SBCTA. 1979.
87. MARTINS, M.C. - *Obtenção e avaliação de curcumina a partir de rizomas secos de cúrcuma (Curcuma longa L.)*. Campinas, 1993. xii, 176 p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) Fac. Eng. Alim. - Universidade Estadual de Campinas.

88. MAYER, F. - The chemistry of natural coloring matters. New York, Reinhold Publishing Corporation. 1943, p. 11-92.
89. McKEOWN, G.G. - Paper chromatography of bixin and related compounds. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 44(2):347-51. 1961.
90. McKEOWN, G.G. & MARK, E. - The composition of oil-soluble annatto food colors. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 45(3):761-6. 1962.
91. McKEOWN, G.G. - Composition of oil-soluble annatto food colors. II. Thermal degradation of bixin. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 46(5):790-6. 1963.
92. McKEOWN, G.G. - Composition of oil-soluble annatto food colors. III. Structure of the yellow pigment formed by the thermal degradation of bixin. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, 48(4):835-7. 1965.
93. MEDEIROS, R.B. - Separação cromatográfica da semente de urucu (*Bixa orellana* L.). *Rev. Bras. Medic.*, 30(11):700-3. 1973.
94. MOLLENHAUER, H.P. - Control of food additives. *Food Control*, 1(2):69-73. 1990.
95. MONGE, A.F. - Factibilidad industrial del achiote (*Bixa orellana*). *Politécnica*, 1(1):39-46. 1967.
96. MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, R.M.V. - Manual de soluções, reagentes e solventes. São Paulo, Edgard Blücher Ltda. 1983. p. 71.
97. MOSS, G.P. & WEEDON, B.C.L. - Chemistry of the carotenoids. In: GOODWIN, T.W., coord. *Chemistry and biochemistry of Plant pigments*. London, Academic Press. 1976. v.1. p. 149- 224.

98. MÜLLER, G. - The legal situation relating to the colouring of foodstuffs in the Federal Republic of Germany. *NATCOL. Quart. Inf. Bull.*, 3:4-8. 1988.
99. MURTHI, T.N.; DEVDHARA, V.D.; PUNJRAT, J.S.; ANEJA, R.P. - Extraction of annatto colours from the seeds of *Bixa orellana* using edible oils. *Ind. J. Dair. Sci.*, 42(4):750-6. 1989.
100. NAJAR, S.V.; BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. - Effects of light, air, antioxidants and pro-oxidants on Annatto extracts (*Bixa orellana*). *Food Chem.*, 29:283-9. 1988.
101. NAMIKI, M. - Antioxidants-antimutagens in foods. *Crit. Rev. Food Sci. & Nutr.*, 29(4):273-300. 1990.
102. NEWSOME, R.L. - Food Colors. A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists Expert Panel on Food Safety & Nutrition. *Food Technol.*, July:49-56. 1986.
103. ONU (Organización de las Naciones Unidas) - Forum: El achiote, problemática y perspectivas. La Molina, Instituto de Comercio Exterior. 1988. 35 p.
104. OPE/PNUD. Estudio del mercado internacional de Bixina y achiote. Baltimore, ATMA International. 1987. 50 p.
105. PERKIN, J. - Colour me safely - not necessarily creatively. *Food Proces.*, 63(1):28-30. 1994.
106. PILLI, D. - O urucum. Aplicação do corante em alimentos. *Alim. Tecnol.*, 6:64-5. 1984.
107. PIMENTEL, G.C. & SPRATLEY, R.D. - Química. Um tratamento moderno. São Paulo, Edgard Blucher Ltda. 1974. 350 p.
108. PRESTON, H.D. & RICKARD, M.D. - Extraction and chemistry of annatto. *Food Chem.*, 5:47-56. 1980.

109. RAJARAMAN, K.; NAYARANAN, C.S.; SUMATHY KUTTY, M.A.; SANKARI KUTTY, B.; MATHEW, A.G. - Ethyl acetate as a solvent for extraction of spice oleoresins. *J. Food Sci. & Technol.*, 18: 101-3. 1981.
110. RAMAMURTHY, M.K. & BHALERAO, V.R. - A thin-layer chromatography method for identifying annatto and other Food colours. *Analyst*, 89:740-4. 1964.
111. REITH, J.F. & GIELEN, J.W. - Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. *J. Food Sci.*, 36: 861-3. 1981.
112. RINKES, I.J. - Beitrag zur kenntnis des Bixins. *Rev. Trav. Chim.*, 48:603-6. 1929.
113. ROCKLAND, L.B. & NISHI, S.K. - Influence of water activity on food product quality and stability. *Food Technol.*, April:42-51. 1980.
114. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Carotenóides. Propriedades e aplicações. In: Carvalho, P.R.N.; coord. *Seminário: Corantes para Alimentos*. Campinas, ITAL. 1988. p. 47.
115. RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - Critical review of provitamin A determination in plant foods. *J. Micronutr. Anal.*, 5:191-225. 1989.
116. RONCAGLILOLO, E.S. - Métodos de extracción e identificación de colorantes en algunos alimentos. *Anal. Fac. Quím. & Farm. Univ. Chile*, 13:118-26. 1961.
117. ROUSEFF, R.L. - High performance liquid chromatographic separation and spectral characterization of the pigments in turmeric and annatto. *J. Food Sci.*, 53(6):1823-6. 1988.
118. SANCHEZ, R.M. - El achiote. *Agric. Trop.*, 21(4):224-7. 1965.

119. SANTOS, E. - O urucu. *Serv. Inform. Agric.*, 818:14. 1958.
120. SEXTON, N. - Annatto - Trends and perspectives. Ireland, *Quest International*. 1991, 7 p.
121. SNYDER, L.R. - Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromat.*, 92:223-30. 1974.
122. SPIRO, M.; KANDIAH, M.; PRICE, W. - Extraction of ginger rhizome kinetic studies with dichloromethane, ethanol, 2-propanol and an acetone-water mixture. *Intern. J. Food Sci. Technol.*, 25(2):157-67. 1990.
123. SRINIVASULU, C. & MAHAPATRA, S.N. - A process for the isolation of bixin. *Res. Ind.*, 34(2):137-8. 1989.
124. TAKAHASHI, M. - Monografias de corantes naturais para fins alimentícios. *Padrões de Identidade e Qualidade*. 2a. ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz. 1987. 118 p.
125. TEE, E.S. - Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit. Rev. Food Science & Nutrit.*, 31(1/2): 103-63. 1992.
126. TEIXEIRA NETO, R.O.; KAREL, M.; SAGUY, I.; MIZRAHI, S. - Oxygen uptake and beta-carotene decoloration in a dehydrated food model. *J. Food Sci.*, 46(3):655-76. 1981.
127. TEIXEIRA NETO, R.O.; VITALI, A.A.; QUAST, D.G. - Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados In: TEIXEIRA NETO, R.O., coord. *Reações de transformação e vida-de-prateleira de alimentos processados*. Campinas, ITAL. 1991. p. 1-26.
128. TESTA, G.A. - Some native dyes. *An. Soc. Cient. Santa Fe*, 3: 122. 1935.
129. TIRIMANNA, A.S.L. - Study of the carotenoid pigments of *Bixa*

- orellana* L. seeds by thin layer chromatography. **Mikroch. Acta (W)**, 2(1-2):11-6. 1981.
130. TONG, L.B. - Preparation and the chemistry of natural food colors from annatto plant. **Mardi Res. Bull.**, 12(3):298-304. 1984.
131. VASQUEZ, R.L. - Diagnóstico situacional de la producción de achiote y alternativas de solución - Perú. Lima, Ministerio de Agricultura. 1988. 6 p.
132. VERGHESE, J. & JOY, M.T. - Isolation of the coloring matter from dried turmeric (*Curcuma longa* L.) with ethylacetate. **Flav. & Fragr. J.**, 4(1):31-2. 1989.
133. VILLELA, G.G. - Sobre a suposta presença de caroteno nas sementes do urucum (*Bixa orellana* L.). **Rev. Bras. Biol.**, 2(2):159-64. 1942.
134. VOGEL, A.I. - **Qualitative Chemical Analysis**. London, Longmans, Green and Co. 1951. 578 p.
135. WEEDON, B.C.L. - Occurrence. In: Isler, O., ed., **Carotenoids**. Basel, Berkhauser Verlag, 1971, p. 49.
136. WILBERG, V.C. - **Quantificação de provitaminas A e carotenóides majoritários em frutos e hortaliças por cromatografia líquida de alta eficiência**. Campinas, 1992. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos). Fac. Eng. Alim. - Universidade Estadual de Campinas.
137. WILBERG, V.C. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. - **Quantificação dos carotenóides de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência**. **Rev. Bras. Cor. Nat.**, 1(1): 145-152. 1992.
138. WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; BLUMETTI, R.F.; OTTERBEIN, E.S. -

The Merck Index. Rahway, Merck & Co. Inc. 1983 p. 182.

139. WOOD, A.; BAKER, D.M.; COPPEN, J.; GREEN, C.L. - Bixinoid assay in annatto seed and its extracts: (i) an evaluation of methods and (ii) recommendations for sample handling. Kent, Natural Resources Institute. 1991. 50 p.
140. WURTZ, M.L. & TORREBLANCA, R.A. - Analysis of annatto seed (*Bixa orellana*) and of the waste generated during extraction of its pigments. Arch. Latinoam. Nutr., 33 (3):606-19. 1983.
141. ZECHMEISTER, L. & ESCUE, R.B. - A stereochemical study of methylbixin. J. Am. Chem. Soc., 66(3): 322-30. 1944.
142. ZILBERBOIM, R.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. - Microencapsulation by a dehydrating liquid: Retention of Paprika oleoresin and aromatics esters. J. Food Sci., 51(5): 1301-6. 1986.